

**Zur Kenntnis der
Fettsäuresynthetase aus Hefe**

Dieter Oesterheld

1967

Zur Kenntnis der Fettsäuresynthetase aus Hefe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Dieter Oesterhelt

aus

München

1967



Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 1967

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Professor Dr. Feodor Lynen

am Biochemischen Institut der Universität München und am Max-Planck-Institut für Zellchemie in der Zeit von Februar 1964 bis Mai 1967 durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer schulde ich für die Unterstützung, die er meiner Arbeit und mir persönlich stets gewährte, großen Dank.

Fräulein H. Bauer danke ich für ihre wertvolle und gewissenhafte Mitarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. GLEICHGEWICHTSMESSUNGEN	4
1. Kondensationsreaktion	5
a) Allgemeines zur Kondensationsreaktion	5
b) Gleichgewichtsmessung	14
2. Acetylierungsreaktion	21
3. Methylmalonat-Beladungsreaktion	24
4. Malonat-Beladungsreaktion	26
III. ZUR VERTEILUNG DER ACYL-RESTE AUF DIE SUBSTRATBINDUNGS- STELLEN DER SYNTHETASE	31
1. Thioesteranalyse	32
a) Acetyl-Enzym	32
b) Methylmalonyl-Enzym	33
c) Malonyl-Enzym	34
d) Acetoacetyl-Enzym	36
2. Kinetische Analyse	39
3. Beladung des Enzyms durch Acyl-Reste	41
a) Beladungskonkurrenz	41
b) Beladung nach Einwirken von SH-Reagenzien	44
4. Peptidanalyse für das Acetyl-Enzym	48
IV. DIE REAKTION VON JODACETAMID UND N-ÄTHYLMALONIMID MIT SYNTHETASE	67
1. Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Inaktivierung und ihre pH-Abhängigkeit	67
2. Malonyl-CoA-Decarboxylase als Produkt der Inhibierung von Fettsäuresynthetase durch Jodacetamid	74
3. Konkurrenz von Acetyl-Coenzym A und Jodacetamid um die periphere SH-Gruppe	81
4. Beladung der Synthetase durch C ¹⁴ -Jodacetamid und Proteolyse des Produktes	82
a) Verlauf der Reaktion bei verschiedenen Temperaturen	82
b) Hydrolyse der C ¹⁴ -Carboxamidomethyl-Synthetase durch Pepsin	84

	Seite
c) Hydrolyse der Carboxamidomethyl-Synthetase durch Trypsin . .	84
5. Die "schnelle" Nebenreaktion von Jodacetamid mit Synthetase	89
V. VERSUCHE ZUM GESAMTKOMPLEX	98
1. Die Deacylaseaktivität der Synthetase	98
2. Die Inhibierung der Synthetase durch Diisopropyl-fluorophosphat . .	103
3. Zur Struktur des Komplexes	107
VI. EXPERIMENTELLER TEIL	113
A. ALLGEMEINE METHODEN	113
1. Verwendete Apparate und käufliche Präparate	113
2. Herstellung von Substraten	114
a) Acyl-CoA-Derivate	114
b) Sonstige Präparate	117
3. Isolierung von Fettsäuresynthetase	118
4. Bestimmung von Substratkonzentrationen und Enzymaktivitäten. .	120
5. Allgemeine analytische Methoden	122
a) Proteinbestimmung	122
b) Abtrennung niedermolekularer Radioaktivität	123
c) Acyl-Beladung von Synthetase	123
d) Radioaktivitätsmessungen	124
B. BESCHREIBUNG DER VERSUCHE	125
Zu Kapitel II.	
1. Kondensationstest	125
2. Quantitative Analyse des Acetoacetyl-Enzyms	125
3. Rückbestimmung der Substrate	126
4. Gleichgewichtsmessung für die Acyl-Beladungsgleichgewichte . .	126
Zu Kapitel III	
1. Thioesteranalyse des Acetat-Restes	126
2. Peroxidation von Acylsynthetase	127
3. Thioesteranalyse des Acetoacetat-Restes	128
4. Inhibierung durch NÄM und JAA	129
5. Peptidanalyse von Acetylsynthetase	129

a) Beladung und Pepsinspaltung	129
b) Säulenchromatographie	130
c) Vorbereitung des Austauschermaterials	130
d) Auftragen des Gemisches und Elution	131
e) Elektrophorese und Papierchromatographie	131
f) Salzsäure Totalhydrolyse nach Stein und Moore	133
6. Nachweis von Serin als der den 4'-Phosphopantethein-Rest tragenden Aminosäure	133
7. Van Slyke-Oxidation des zentralen Peptides	135
8. Analyse der Dansyl-Aminosäuren	135
9. Edmann-Abbau im Millimikromol-Maßstab nach Hartley	136
10. Umsetzung des peripheren Peptidthioesters zum Thioäther	136

Zu Kapitel IV

1. Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten	138
2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH	138
3. Decarboxylierung von Malonyl-Coenzym A	138
a) Methode I	138
b) Methode II	139
c) Methode III	139
4. Schutzversuche mit Acetyl-CoA	139
5. Temperaturabhängigkeit der C ¹⁴ -JAA-Beladung von Synthetase	139
6. Spaltung von C ¹⁴ -Carboxamidomethyl-Synthetase durch proteolytische Enzyme	140
a) Peptische Spaltung	140
b) Tryptische Spaltung	140
7. DEAE-Sephadex-Chromatographie und Fingerprintanalyse	140
8. Produktanalyse der Fettsäuresynthetasereaktion	141

Zu Kapitel V

1. Messung der Deacylaseaktivität von Synthetase	141
2. Diisopropyl-fluorophosphat-Hemmung von Synthetase	142
3. Schutzversuche vor DFP	142
4. Peptidanalyse nach DFP-Einwirkung und Acylbeladung	142
5. Nachweis von Fettsäurederivaten in Synthetasepräparationen	142

	Seite
VII. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	145
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	147
LEBENS LAUF	150

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Synthetase	Der Fettsäuresynthetasekomplex aus Hefe
$E \begin{smallmatrix} \swarrow \text{SH} \\ \searrow \text{SH} \end{smallmatrix}$	Enzym
NAD	Diphosphopyridin-nucleotid
NADH	reduziertes Diphosphopyridin-nucleotid
NADP	Triphosphopyridin-nucleotid
NADPH	reduziertes Triphosphopyridin-nucleotid
CoA, CoASH	Coenzym A
FMN	Flavinmononucleotid
ATP	Adenosintriphosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
μ	mikro
IpM	Impulse pro Minute
mg	Milligramm
g	Gramm
E, mE	internationale Einheit, Millieinheit
ΔE	Extinktionsänderung
TCE	Trichloressigsäure
PAS	Perameisensäure
EDTA	Äthylendiaminotetraacetat
JAA	Jodacetamid
NÄM	N-Äthylmaleinimid
DFP	Diisopropyl-Fluorophosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Pyr Form	Pyridinformiat-Puffer
Pyr Ac	Pyridinacetat-Puffer
KPO ₄	Kaliumphosphatpuffer
DANSYL	Dimethylamino-naphthalinsulfonyl-Rest
DEAE	Diäthylaminoäthyl-Rest
CM	Carboxymethyl-Rest
UV	Ultraviolett

IR	Infrarot
V	Volumen
Z. T.	Zimmertemperatur
DTNB	5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure



Elektronenoptisches Bild der Fettsäuresynthetasepartikel

Vergr.: 40,000 x 6 Aufnahme: A. Preuss und P. Hofschneider

I. EINLEITUNG

Der Aufbau von Fettsäuren in der Zelle wie auch die Biosynthese von Aromaten und einigen Antibiotica stellen Beispiele der sogenannten Polyacetatregel dar, nach der die Synthese des Kohlenstoffgerüsts dieser Verbindungen durch eine Kopf-Schwanz-Polykondensation von Essigsäuremolekülen verwirklicht wird (1-3).

Im Verlauf der letzten 15 Jahre wurden am Beispiel des Fettsäureabbaues und der Fettsäure-de-novo-Synthese zwei wichtige Prinzipien dieser Regel erkannt. Erstens verlaufen alle beteiligten Reaktionen auf dem hohen Energieniveau von Thioestern des Coenzym A ab (4,5) und zweitens beteiligt sich bei dem Aufbau der Ketten aus thermodynamischen Gründen Malonyl-CoA in einer Kondensation unter Decarboxylierung (6-10). Abbildung 1 gibt diese Tatsachen schematisch wieder.

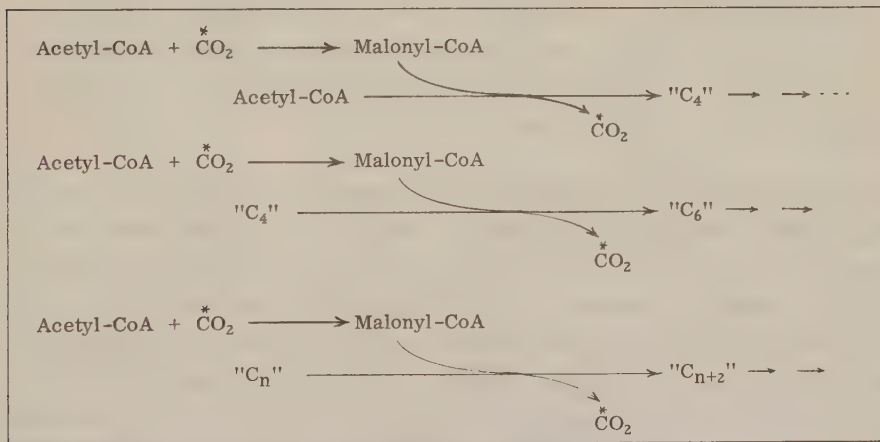
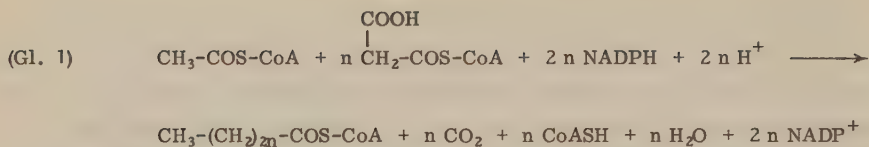


Abbildung 1 Aufbau von Kohlenstoffketten unter Beteiligung von Malonyl-CoA (schematisch)

"C₄", "C₆" sind für Thioester der betreffenden Kettenlängen geschrieben.

Da auch Beweise für die Gültigkeit dieser Prinzipien bei der Aromatensynthese vorliegen (2), gewinnen Studien des enzymatischen Mechanismus der Fettsäuresynthese Modellcharakter für andere, die Polyacetatregel befolgende Biosynthesen.

Im Laboratorium von LYNEN wurde ein Fettsäuresynthetase benanntes Enzym aus Hefe isoliert, das die Umsetzung von Acetyl- und Malonyl-Coenzym A mit NADPH zu höheren Acyl-Coenzym-A-Derivaten nach Gleichung (1) zu katalysieren vermag (11,12).



Es handelt sich bei dem Enzym um einen sogenannten Multienzymkomplex, der sieben verschiedene enzymatische Teilfunktionen in Form eines Proteinmoleküls vom ungefähren Molekulargewicht $2,3 \cdot 10^6$ auszuüben vermag. Bald stellte sich heraus, daß sämtliche Reaktionen in kovalenter Bindung der Substrate an das katalysierende Protein stattfinden und erst nach 7-8maliger cyclischer Wiederholung das fertige Produkt, der Palmityl- oder Stearyl-Rest auf freies Coenzym A zurückübertragen wird (14, 15). Im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, daß zwei verschiedene Thiolgruppen am Enzym für die Katalyse unentbehrlich sind, von LYNEN als "zentrale" bzw. "periphere" SH-Gruppe benannt. 1961 postulierte LYNEN das in Abbildung 2 wiedergegebene Schema der enzymatischen Katalyse an der Synthetase, in dem den damaligen Ergebnissen Rechnung getragen wurde (12).

In einem ersten Schritt, der Startreaktion, wird ein Acetyl-Rest auf das Enzym übertragen. Dieser kondensiert mit einem auf die "zentrale" SH-Gruppe des Enzyms übertragenen Malonyl-Rest (I, Abb. 2) unter Decarboxylierung zu einem Acetoacetyl-Rest (II), der dann in Umkehr der bekannten reversiblen Reaktionen des Fettsäureabbaues (III-V) in einen Butyryl-Rest umgewandelt wird. Nach seiner Übertragung auf die "periphere" SH-Gruppe (VI) wiederholen sich die Reaktionen cyclisch, bis eine Kettenlänge von etwa 16-18 Kohlenstoffatomen erreicht ist. Dann wird der Acyl-Rest in einer Abschlußreaktion auf Coenzym A übertragen.

Die Richtigkeit dieses Schemas erwies sich in der Folgezeit sowohl durch weitere Versuche an der Synthetase (14-17) wie auch durch die Untersuchungen an den Fettsäuren synthetisierenden Systemen aus *Escherichia coli*, Taubenleber und Pflanzen durch die Arbeitskreise um WAKIL, VAGELOS, PORTER und STUMPF (78-81). Während es sich beim Taubenleberenzym ebenfalls um einen Multienzymkomplex handelt, der im Gegensatz zum Hefeenzym allerdings die Reduktion des ungesättigten Acyl-Restes nicht durch ein Flavinenzym katalysiert, kann das System aus *E. coli* nur in Form seiner Teilkomponenten isoliert werden. Wenn dies auch für die mechanistische Aufklärung der

Einzelreaktionen experimentelle Erleichterung bringt, bietet sich die Frage der molekularen Organisation und Koordinierung der Fettsäuresynthese am Hefeenzym schärfer.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, das Gleichgewicht der Kondensationsreaktion zu messen und weitere Beweise für den Mechanismus der Fettsäuresynthese im Sinne des in Abbildung 2 postulierten Schemas zu erbringen. Dabei standen die ersten drei Reaktionen, die zum Acetoacetyl-Enzym führen, im Vordergrund.

II. GLEICHGEWICHTSMESSUNGEN

Die Aufklärung der Reaktionen des Fettsäureabbaues durch LYNEN hatte die Reversibilität aller beteiligten Reaktionen gezeigt. Einzig die thioklastische Spaltung des Acetoacetyl-CoA durch das Enzym Thiolase unter Beteiligung von Coenzym A besaß ein völlig auf Seiten des Acetyl-CoA liegendes Gleichgewicht. Die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion wurde von DECKER (13) zu $1,6 \cdot 10^{-5}$ (25°C, pH 7.0) ermittelt (Abb. 3 I). Es war nun interessant, den thermodynamischen Vorteil, den eine Kondensation unter Decarboxylierung mit sich bringt, quantitativ zu erfassen. Da, wie erwähnt, an der Fettsäuresynthetase aus Hefe die Synthese von Palmityl-CoA aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in kovalenter Bindung der Substrate an das Enzym abläuft, ist das Reaktionsprodukt der Kondensation ein enzymgebundener Acetoacetat-Rest, das Acetoacetyl-Enzym, im Gegensatz zum Acetoacetyl-CoA als dem Substrat der Thiolasereaktion (Abb. 3 II).

Für unsere Messungen war deshalb das Enzym Reaktant, und nicht Katalysator, was zwei Schwierigkeiten mit sich brachte:

1. Die geringe Stabilität des Acetoacetyl-Enzyms, die sich in der von LYNEN und HOPPER festgestellten Spontanhydrolyse zu freiem Enzym und Acetoacetat äußerte (14).
2. Das Problem der Enzymkonzentration, die durch Proteinmessung allein nicht genau bestimmt werden konnte, da vermutlich enzymatisch inaktive Synthetasemoleküle auch nicht an der Kondensationsreaktion teilnehmen.

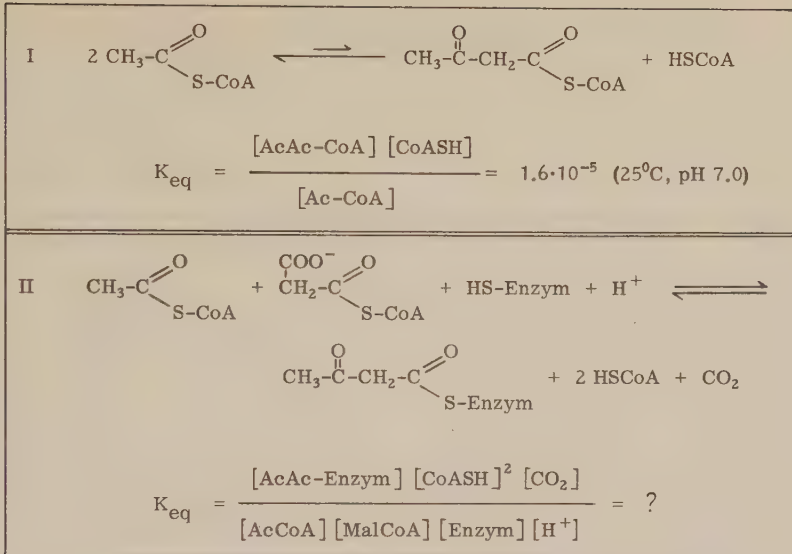


Abbildung 3 Thiolasereaktion (I) und Kondensationsreaktion (II)

1. Kondensationsreaktion

a) Allgemeines zur Kondensationsreaktion

Der Zeitverlauf der Kondensationsreaktion kann durch Messung des entstehenden Acetoacetyl-Enzyms verfolgt werden (15). Setzt man 1-C¹⁴-Acetyl-CoA in die Reaktion ein, so erhält man ein am C-Atom 3markiertes Acetoacetyl-Enzym. Dem denaturierten, gewaschenen Protein wird S-Acetoacetyl-N-acetyl-cysteamin als Träger zugesetzt und das Gemisch alkalisch verseift. Die entstehende Acetessigsäure wird im Säuren durch Erhitzen decarboxyliert und im gebildeten 2-C¹⁴-Aceton nach Überführen in sein 2,4-Dinitrophenylhydrazon die inkorporierte Gesamtradioaktivität gemessen. Diese kann mit der bekannten spezifischen Radioaktivität des eingesetzten C¹⁴-Acetyl-CoA in die Menge des entstandenen Acetoacetyl-Enzyms umgerechnet werden. Abbildung 4 zeigt eine solche Zeitabhängigkeit. Nach etwa zwei Minuten nimmt die inkorporierte Radioaktivität nicht mehr zu.

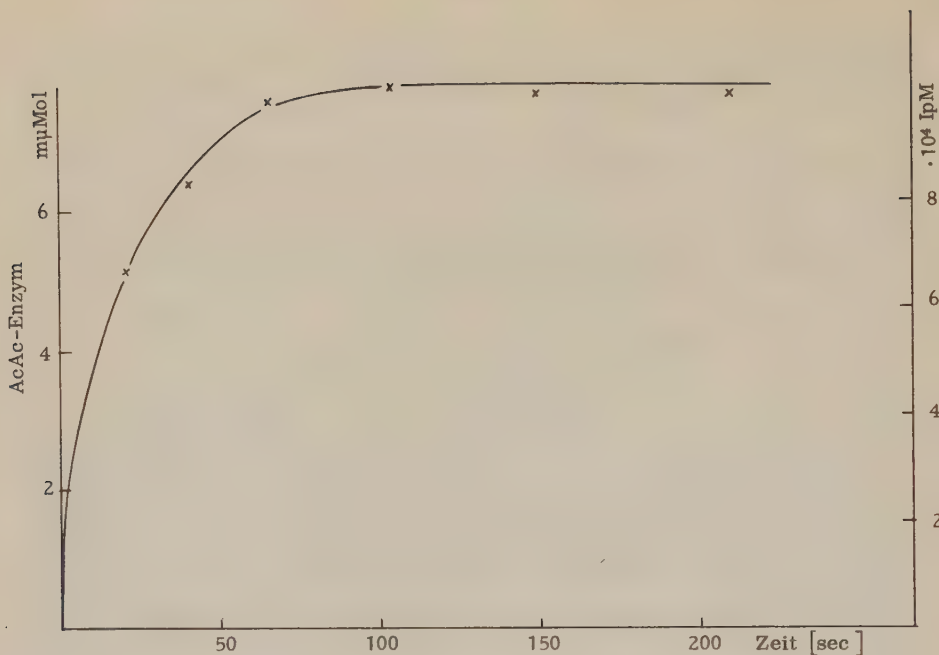


Abbildung 4: Zeitabhängigkeit der Kondensationsreaktion

400 μMol KPO_4 pH 6.9; 30 μMol Cystein; 0,02 μMol 1- C^{14} -Acetyl-CoA ($1,33 \times 10^7$ IpM/ μMol); 7,5 mg Enzym (1000 mE/mg); 0,02 μMol CoASH; Start mit 0,02 μMol Mal-CoA;

T = 0°C; V = 3 ml; Stopp mit TCE;

Bestimmt wurde proteingebundene Radioaktivität Aufarbeitung siehe expt. Teil S. 125

Die Hydrolyse des entstandenen Acetoacetyl-Enzyms wurde im folgenden Versuch quantitativ nachgewiesen (siehe auch 14). Zu Aliquoten eines Ansatzes wurde zu bestimmten Zeiten NADPH im Überschuß gegeben und die Reaktion drei Minuten nach Zugabe des NADPH gestoppt. Alles Acetoacetyl-Enzym mußte jetzt in Produkte der Synthetasereaktion, also in Palmityl- und Stearyl-Coenzym A übergeführt sein, und die im Aceton-2,4-Dinitrophenylhydrazon gefundene Radioaktivität konnte nur von nicht reduzierbarer, d.h. freier Acetessigsäure herrühren (Kurve I in Abb. 5). In einem Parallelversuch wurde durch Verseifung des Gesamtansatzes nach Trägerzusatz die Summe aus proteingebundener und freier Acetessigsäure bestimmt (Kurve II in Abb. 5). Abbildung 5 zeigt das Ergebnis des Versuches; man entnimmt für die Geschwindigkeit der Hydrolyse den Wert:

$$v = 0.04 = \frac{\mu\text{Mol Acetoacetyl-Enzym hydrolysiert}}{\text{mg Enzym} \cdot \text{Minute}} (^{\circ}\text{C})$$

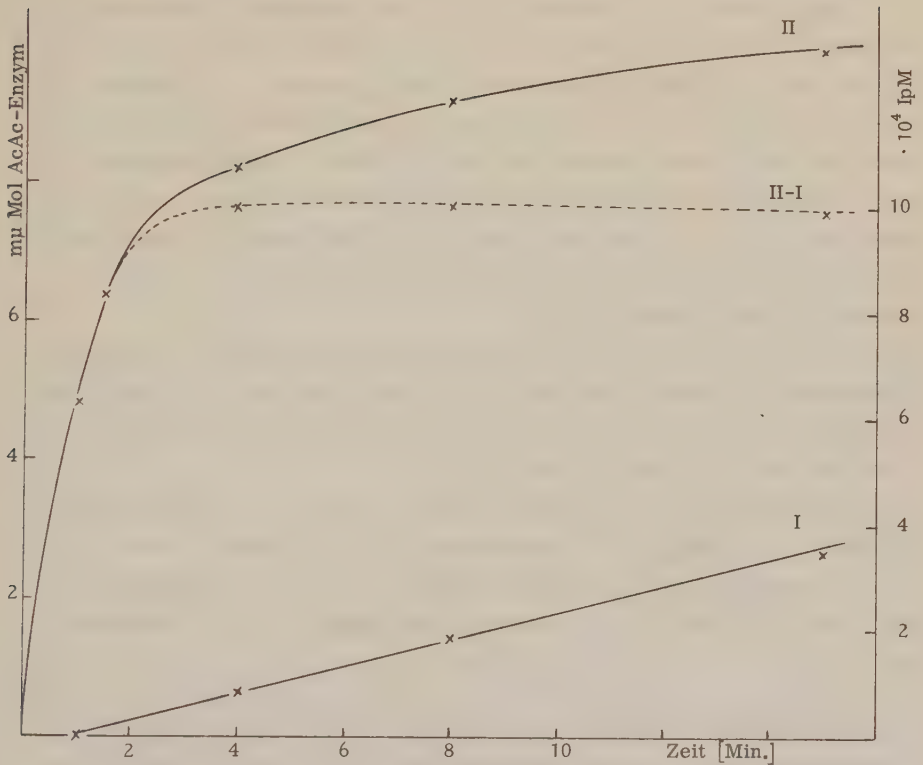


Abbildung 5: Bilanz der Acetessigsäurebildung

150 $\mu\text{Mol KPO}_4$ pH 6.5; 20 $\mu\text{Mol Cystein}$; 0,05 $\mu\text{Mol 1-C}^{14}\text{-Acetyl-CoA}$ ($1,33 \cdot 10^7 \text{ IpM}/\mu\text{Mol}$); 4,6 mg Enzym (1000 mE/mg); Start mit 0,1 $\mu\text{Mol Malonyl-CoA}$;
 $T = 0^{\circ}\text{C}$; $V = 2 \text{ ml}$; Stopp mit TCE; Aufarbeitung siehe expt. Teil S. 125
 I Nichtreduzierbare Acetessigsäure; II Gesamte Acetessigsäure

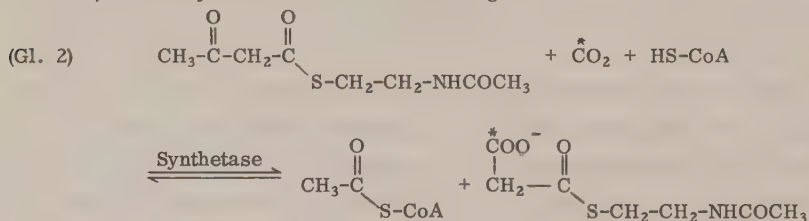
Klar ist die rasche Gleichgewichtseinstellung und folgende langsame Hydrolyse des entstandenen Acetoacetyl-Enzyms zu erkennen. Als günstigste Inkubationszeit für die Gleichgewichtsmessungen ergibt sich die Zeit von zwei Minuten, in der einerseits bereits Gleichgewicht herrscht, andererseits die Hydrolyse des Acetoacetyl-Enzyms noch keine Rolle spielt.

Das zweite Problem der Gleichgewichtsmessung stellte sich in der Frage der wahren Enzymkonzentration. Nach Untersuchungen HAGENS ist der komplette Enzymsatz dreimal in der Synthetasmolekel enthalten (16). Wenn die Enzymlösung, bedingt etwa durch eine niedrige spezifische Aktivität der verwendeten Präparate, kondensationsinaktive Molekeln enthält, kann die Enzymkonzentration nicht gleich dreimal der Proteinkonzentration angenommen werden. Falls die Kondensation den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtsynthese darstellt, muß nach den Gesetzen der Reaktionskinetik die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion von der Konzentration des Acetoacetyl-Enzyms linear abhängen, und es ist dann eine Korrektur von der gemessenen Aktivität auf den Anteil kondensationsaktiver Molekel möglich. Nachfolgend sind einige Versuche beschrieben, die diese Annahme stützen.

Coenzym A ist Reaktionsprodukt der Kondensationsreaktion und drängt als solches das Kondensationsgleichgewicht auf die Seite der Reaktionspartner Acetyl-CoA und Malonyl-CoA. Ebenso hemmt es die Gesamtsynthese, gemessen am NADPH-Verbrauch im optischen Testsystem (17) (siehe exp. Teil S. 121).

Abbildung 6 zeigt die Parallelität der experimentellen Kurven, in denen Prozent Restaktivität bzw. Prozent Acetoacetyl-Enzymbildung gegen die eingesetzte Coenzym-A-Konzentration aufgetragen sind. Die Parallelverschiebung von Kurve I gegenüber Kurve II kann durch Änderung der Konzentrationen von Acetyl- oder Malonyl-CoA aufgehoben werden.

Eine zweite Beweismöglichkeit bietet der Vergleich von katalytischer Aktivität der Synthese in der Kondensation und der Gesamtsynthese. Da die Bildung des Acetoacetyl-Enzyms keine katalytische Reaktion ist, wurde, um den Teilschritt der Kondensation zu testen, die Spaltung des S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamins durch $C^{14}O_2$ gewählt, eine Reaktion, die von Synthetase nach der Gleichung



katalysiert wird. Sie stellt ein Modell der Rückreaktion der Kondensation dar und wurde erstmals von LYNNEN beschrieben (12).

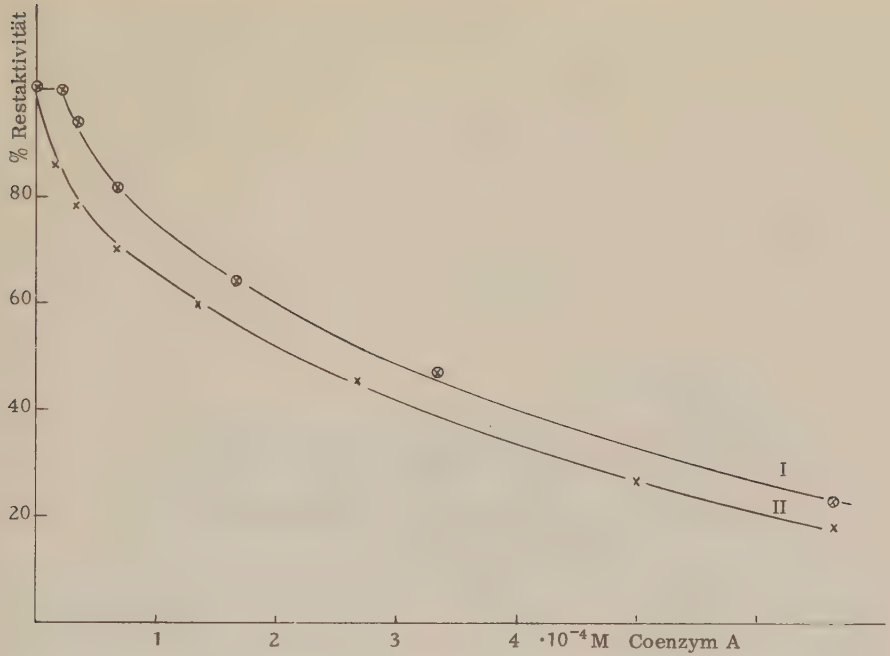


Abbildung 6: Coenzym-A-Hemmung der Kondensationsreaktion (I) und der Fettsäuresynthese (II)

I: 100 μ Mol KPO_4 pH 6.5; 15 μ Mol Cystein; 0,04 μ Mol 1- C^{14} -Acetyl-CoA ($1,33 \times 10^7$ IpM/ μ Mol); 4,6 mg Enzym; Start mit 0,125 μ Mol Mal-CoA;
 T = 0°C; V = 2 ml; Stopp mit TCE; Aufarbeitung siehe expt. Teil S. 125

II: Standardtest siehe expt. Teil S. 121

Der Test wird ausgeführt, indem man die Menge fixierter Radioaktivität in Abhängigkeit von der Zeit mißt. Die folgenden vier Abbildungen (7-10) charakterisieren die Synthetase als das katalysierende Enzym.

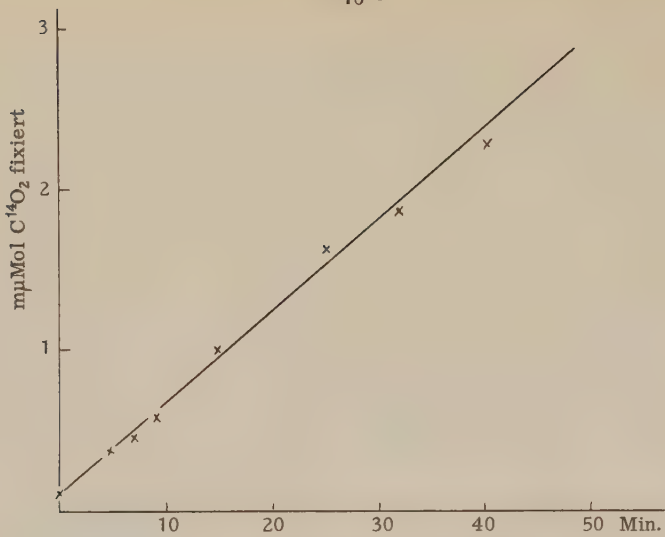


Abbildung 7 Zeitabhängigkeit für die kondensierende Enzymaktivität der Synthetase

150 μ Enzym (1100 mE/mg); Ausführung siehe Exp. Teil S. 125

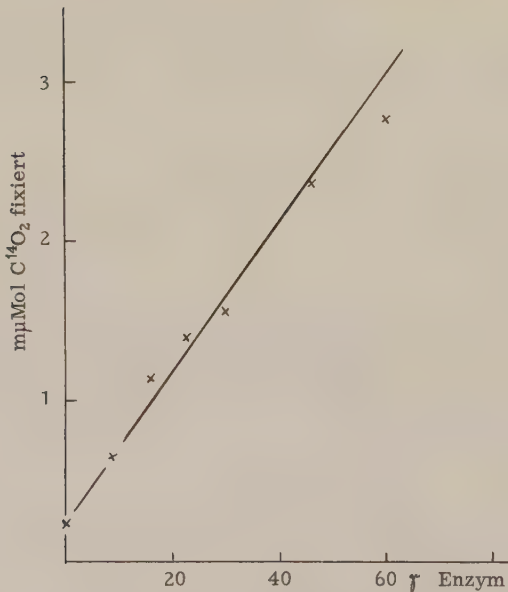


Abbildung 8 Enzymabhängigkeit für die kondensierende Enzymaktivität der Synthetase

Ausführung siehe S. 125

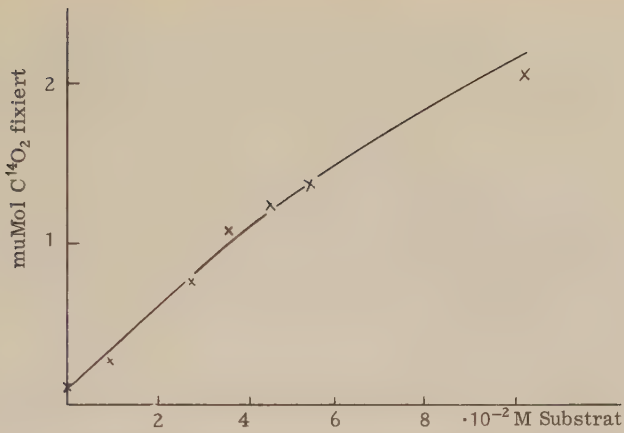


Abbildung 9 Substratabhängigkeit für die kondensierende Enzymaktivität der Synthetase

150 γ Enzym (1100 mE/mg); Ausführung siehe Seite 125

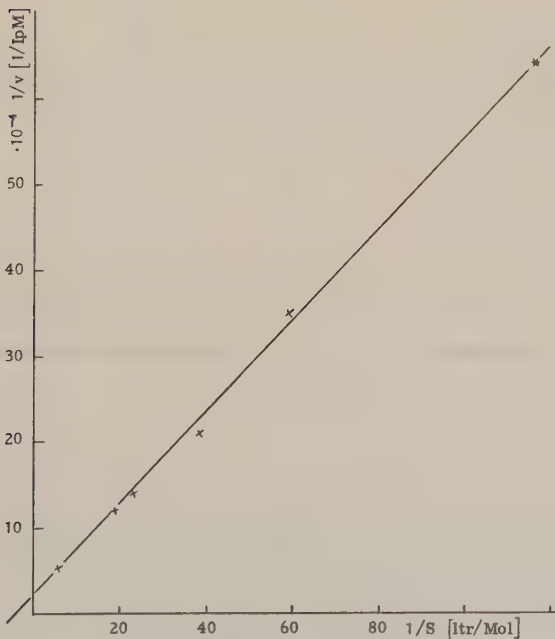


Abbildung 10 Lineweaver-Burk-Diagramm zur Ermittlung der Michaelis-Konstanten von S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin für die kondensierende Aktivität der Synthetase

Meßwerte aus Abb. 9

Es besitzt für das Substrat S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin eine Michaelis-Konstante von $K_M = 0,25$ (Mol/ltr) und eine Wechselzahl von $8,5$ (min^{-1}). In den Messungen verzichteten wir auf Substratsättigung; die Standardkonzentration in der Testmischung betrug $5 \cdot 10^{-2}$ M. Als Einheit der Enzymaktivität gilt der Umsatz von $1 \mu\text{Mol}$ Substrat/Minute durch 1 mg Enzym. Es wurden nun einige Enzympräparate auf ihre katalytische Fähigkeit in der Kondensationsreaktion hin geprüft. Man ersieht aus der Geraden in Abbildung 11, daß eine Änderung der Aktivität im Kondensationsschritt eine proportionale Änderung der Gesamtaktivität verursacht.

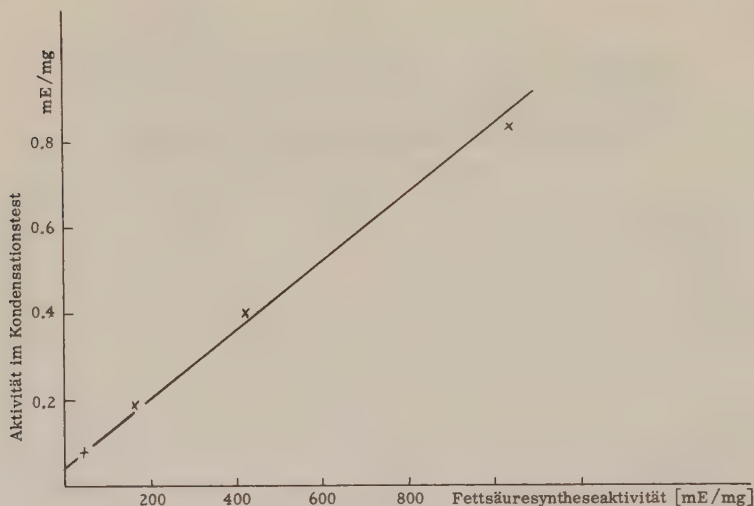


Abbildung 11: Vergleich von Synthetaseaktivität im Kondensationstest und Standardtest
(Ausführung siehe S. 125 bzw. 121)

Einen weiteren Beweis für die Kondensationsreaktion als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Fettsäuresynthese versuchten wir durch die Linearität der Beziehung von Fettsäuresynthese-Aktivität und maximaler Beladung des Enzyms mit Acetoacetyl-Resten zu führen. Letztere wird durch eine Erhöhung der Malonyl- und Acetyl-CoA-Konzentration auf $5 \cdot 10^{-4}$ molar bei einer Coenzym A-Konzentration 0 erreicht (vgl. S. 15).

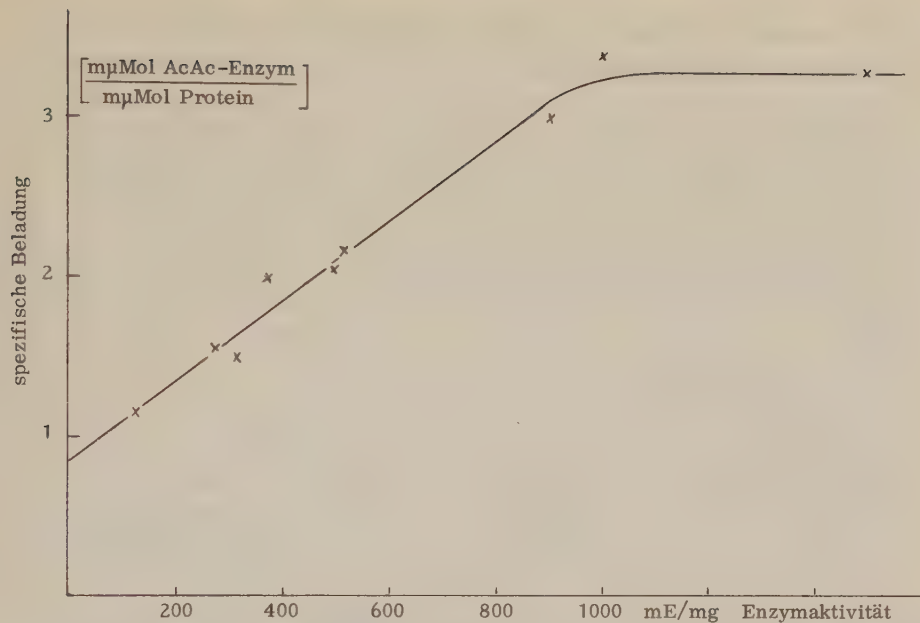


Abbildung 12 Beziehung zwischen enzymatischer Aktivität und maximaler Beladung des Enzyms mit Acetoacetyl-Resten

Zur Ausführung siehe exp. Teil Seite 121 und Seite 125

Das Ergebnis in Abbildung 12 zeigt, daß Linearität nur in einem gewissen Bereich der Kurve gegeben ist. Da die Kurve den Nullpunkt nicht schneidet, muß in ihrem Anfangsteil eine der sechs anderen Teilaktivitäten und nicht die kondensierende Aktivität geschwindigkeitsbestimmend sein. Weiter ist Abbildung 12 zu entnehmen, daß bei einer enzymatischen Aktivität von etwa 1000 mE/mg die spezifische Beladung des Enzyms mit Acetoacetat-Resten nicht mehr zunimmt, während die spezifische Aktivität von Enzympräparaten den Wert von 2500 mE/mg erreichen kann.

Zur Erklärung könnte man sich vorstellen, daß die Geschwindigkeit der Acetoacetyl-Enzymbildung durch Schädigung eines Teilschrittes der Kondensation herabgesetzt ist, und damit die Gesamtsynthese langsamer verläuft (Abszisse). Innerhalb der vergleichsweise langen Zeit von 2 Minuten erreichen jedoch solche Präparate die maximale spezifische Beladung (Ordinate) und erst wenn auch diese Zeit nicht mehr ausreicht, findet man lineares Verhalten von spezifischer Beladung und enzymatischer Aktivität.

Es sei noch erwähnt, daß auch im Fettsäuren synthetisierenden Enzymsystem aus *Escherichia coli* das kondensierende Enzym die kleinste Wechselzahl besitzt (18).

Als praktische Konsequenz ergab sich für die Gleichgewichtsmessungen, daß im allgemeinen die freie Enzymkonzentration gleich dreimal der Proteinkonzentration abzüglich der Acetoacetyl-Enzymkonzentration angenommen wurde und nur in Fällen, wo Präparate mit einer spezifischen Aktivität unter 1000 mE/mg eingesetzt wurden, die totale Enzymkonzentration durch maximale Beladung mit Acetoacetyl-Resten ermittelt wurde.

1. b) Gleichgewichtsmessungen

Die zu den Messungen verwendete Apparatur zeigt Abbildung 13.

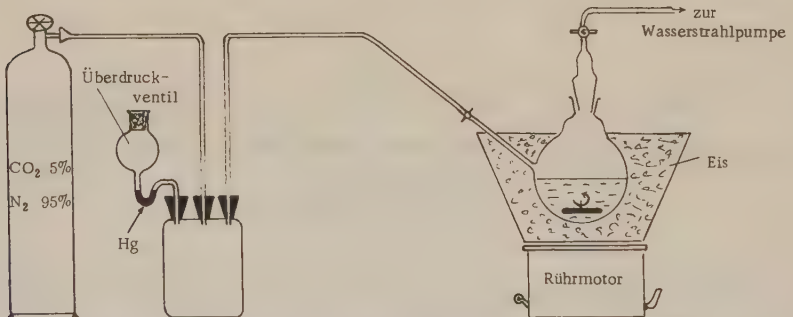


Abbildung 13 Apparatur zum Messen des Gleichgewichts der Kondensationsreaktion

Sie gewährleistet eine konstante Kohlendioxidkonzentration $[CO_2]$ in der Lösung nach dem Henry-Dalton-Gesetz (abgewandelte Form):

$$(Gl. 3) \quad [CO_2] = \frac{P \cdot \alpha \cdot CO_2 \cdot 1000}{760 \cdot 22400 \cdot 100}$$

$$(Gl. 4) \quad [CO_2] = P \cdot \alpha \cdot CO_2 \cdot 0,587 \cdot 10^{-6} \text{ (Mol/ltr)}$$

wobei P der Atmosphärendruck, CO_2 Prozent Gas in der betreffenden Atmosphäre und α der Bunsen-Absorptionskoeffizient sind. Vor dem Einpipettieren der Inkubationsmischung wurde das Reaktionsgefäß durch mehrfaches Evakuieren und Belüften mit

der Misch-Atmosphäre von 5 % CO_2 und 95 % N_2 (Bombe) gefüllt. Die weiteren Operationen wurden dann bei strömendem Gasfluß ausgeführt. Um eine rasche Äquilibration zwischen Lösung und Gasphase zu erreichen, gibt man die berechnete CO_2 -Menge zusätzlich der nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung errechneten Bicarbonatkonzentration der Inkubationsmischung zu. Der komplette Reaktionsansatz enthält alle Reaktionspartner mit Ausnahme des Acetoacetyl-Enzyms, dessen Gleichgewichtskonzentration nach der auf Seite 5 beschriebenen Methode gemessen wird. Die Gleichgewichtskonzentrationen der Partner ergeben sich prinzipiell durch Subtraktion der Acetoacetyl-Enzymkonzentration von den Konzentrationswerten des Enzyms, Acetyl-CoA's und Malonyl-CoA's und doppelte Addition zur Coenzym-A-Konzentration.

In den folgenden Messungen wurde nun bei Konstanz aller anderen Reaktionspartner ein Reaktant in seiner Konzentration variiert und gegen diese Werte die jeweils gefundene Acetoacetyl-Enzymkonzentration aufgetragen. Abbildung 14 zeigt eine solche Messung am Beispiel der Coenzym-A-Konzentrationsvariation.

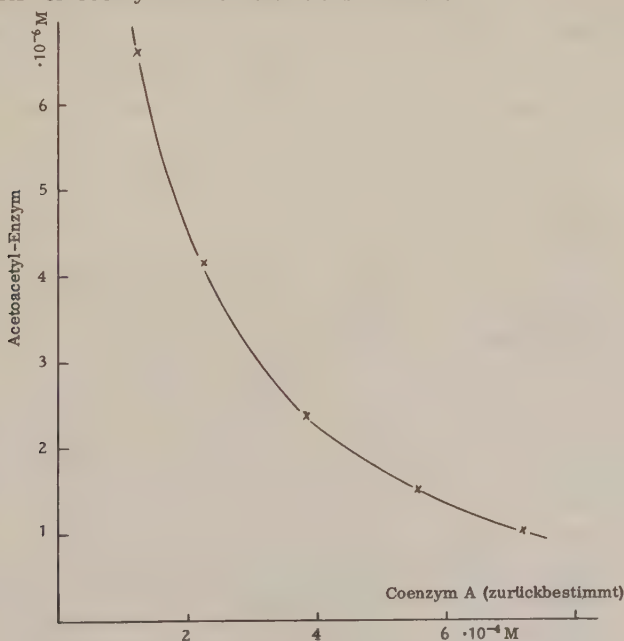


Abbildung 14 Coenzym A-Hemmung der Kondensation

100 $\mu\text{Mol KPO}_4$ pH 6.5; 15 $\mu\text{Mol Cystein}$; 5 % CO_2 -Atmosphäre; 0,1 $\mu\text{Mol 1-C}^{14}\text{-Acetyl-CoA}$ ($1,33 \times 10^7$ IpM/ μMol); 4,6 mg Enzym (1500 mE/mg); Start mit 0,09 $\mu\text{Mol Mal-CoA}$; $T = 0^\circ\text{C}$; $V = 1,5$ ml; Stopp mit TCE; Aufarbeitung siehe Seite 125

Alle Messungen wurden bei 0°C ausgeführt, um unerwünschte katalytische Nebenreaktionen möglichst gering zu halten. Im Verlauf der Versuche ergab sich jedoch, daß ein Blindwert von freiem Coenzym A, hervorgerufen durch einen geringen Coenzym-A-Gehalt der Acyl-CoA-Lösungen, nicht zu vernachlässigen war und die Meßwerte verfälschte. Es wurde deshalb der Coenzym-A-Gehalt der Inkubationsmischung nach Beendigung des Versuches enzymatisch bestimmt. Ebenso rückbestimmt wurden Acetyl-CoA und Malonyl-CoA, da Deacylierung oder Decarboxylierung, durch das Enzym verursacht, nicht ausgeschlossen werden konnten. Blindversuche ergaben, daß die Bestimmung, sofern die Konzentration 0,3 M TCE beim Abstoppen der Reaktion nicht überschritten wird, quantitativ verläuft (siehe exp. Teil S.126). Die Rückbestimmung aus dem Versuchsansatz ergab für Malonyl-CoA 80-90 %, während für Acetyl-CoA nur 70 % wiedergefunden wurden. Ursache hierfür dürfte ziemlich sicher die Deacylierung durch das Enzym (vgl. S. 98) sein.

Eine besondere Versuchsanordnung erforderte die Variation der CO_2 -Konzentration. Sie läßt sich bei Konstanz von Temperatur, Volumen und pH nur über den Partialdruck des Kohlendioxids in der Atmosphäre über einer Lösung verändern. Eine einfache Apparatur zum Mischen von CO_2 und Stickstoff in beliebigem Verhältnis gibt Abbildung 15 wieder.

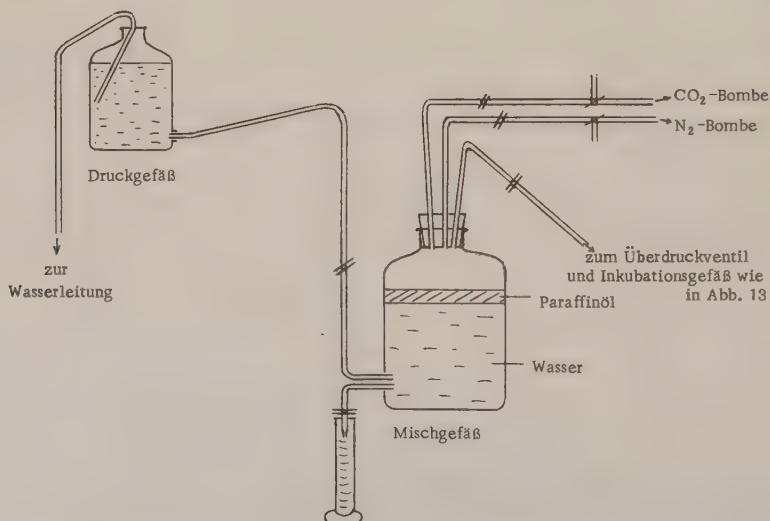


Abbildung 15 Meßanordnung zur Variation der Kohlendioxid-Konzentration

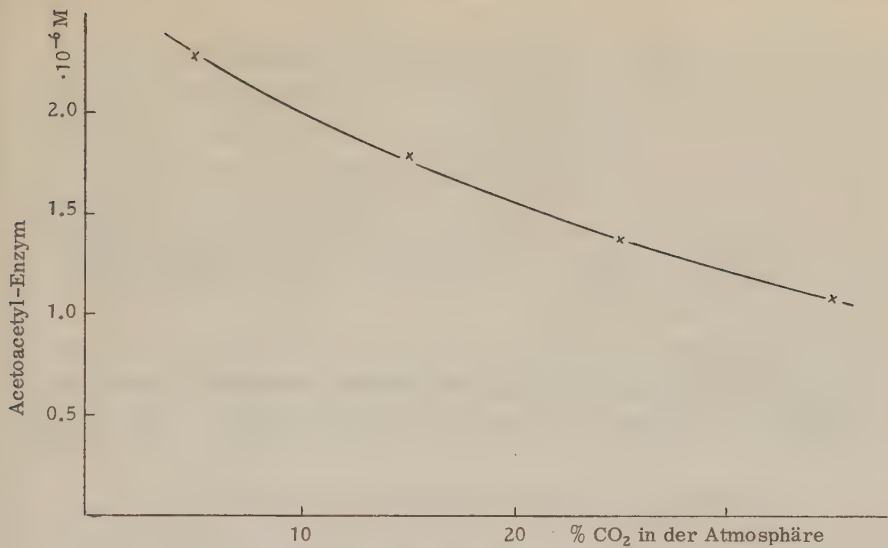
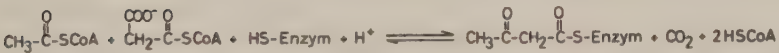


Abbildung 16 CO₂-Hemmung der Kondensation

150 µMol KPO₄ pH 6.5; 15 µMol Cystein; 0,08 µMol 1-C¹⁴-Acetyl-CoA (6,3 x 10⁷ IpM/µMol); 4,6 mg Enzym (770 mE/mg); 0,27 µMol CoASH; Start mit 0,09 µMol Mal-CoA; T = 0°C; V = 1,5 ml; Stopp mit TCE; Aufarbeitung siehe Seite 125

Tabelle 1

Werte zum Gleichgewicht der Kondensationsreaktion



HS CoA µM	CO ₂ µM	AcAc-Enzym µM	Mal-CoA µM	Ac-CoA µM	HS-Enzym µM	H ⁺ µN	K _{eq} x 10 ⁻⁵
187.5	3390	2.120	59.2	52.7	2.420	0.316	1.06
187.0	10080	1.815	59.7	53.0	2.725	0.316	2.50
186.8	17000	1.425	60.0	53.3	3.115	0.316	2.62
186.3	23 800	1.115	60.3	53.7	3.425	0.316	2.62
120.0	3 660	1.295	58.7	65.3	0.425	0.316	1.33
220.0	3 660	0.880	59.1	65.7	0.840	0.316	1.51
376.0	3 660	0.510	59.5	66.1	1.210	0.316	1.75
553.0	3 660	0.324	59.7	66.3	1.396	0.316	2.08
720.0	3 660	0.222	59.9	66.4	1.498	0.316	2.12
220.0	3 660	1.025	59.0	65.6	0.695	0.316	2.14
220.0	3 660	1.220	118.8	65.4	0.500	0.316	1.77

Man erhält als Mittelwert der scheinbaren Gleichgewichtskonstante

$$K'_{eq} = \frac{[\text{AcAc-Enzym}] \cdot [\text{CoASH}]^2 \cdot [\text{CO}_2]}{[\text{Ac-CoA}] \cdot [\text{Mal-CoA}] \cdot [\text{Enzym}] \cdot [\text{H}^+]} = 1.95 (\pm 0.9) \cdot 10^5 \text{ (} 0^\circ\text{C)}$$

In einem abschließenden Versuch zur Gleichgewichtsmessung sollte die formale Beteiligung eines Protons an der Reaktion durch Variation der Wasserstoffionen-Konzentration im Experiment geprüft werden.

Um die Veränderlichkeit der Enzymaktivität und damit eine eventuelle Änderung der Kondensationsaktivität bei den Messungen auszuschließen, wurde jeder Messung eine solche der maximalen Beladung angefügt. Tabelle 2 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

Tabelle 2 Variation der Wasserstoffionen-Konzentration

HSCoA μM	CO ₂ μM	AcAc -Enzym μM	Mal-CoA μM	Ac-CoA μM	HS-Enzym μM	H ⁺ μN	K _{eq} · 10 ⁻⁵
100	3630	2.18	93	40	0.49	1	0.44
100	3630	2.26	93	40	0.56	0.316	1.22
100	3630	2.22	93	40	0.77	0.1	2.84

Der Fehler dieser Messung ist wesentlich höher als der in den Werten von Tabelle 1, wie aus dem scheinbaren Anstieg der Konstante um den Faktor 6.5 zu ersehen ist.

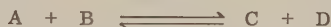
Sind in einer Reaktion Ionen Reaktionspartner, so muß für die Berechnung der Konzentration eines Reaktanten bei verschiedenen pH-Werten die Konstante seines Säure-Base-Dissoziationsgleichgewichtes bekannt sein (19, 20). Für Malonyl-CoA, Acetyl-CoA und Coenzym A entfällt im pH-Bereich von 7 eine Umrechnung, da hier alle Phosphorsäuregruppen wie auch die Carboxylgruppe des Malonyl-CoA vollständig dissoziiert sind.

Dagegen ist der Zustand des Enzyms und Acetoacetyl-Enzyms in Abhängigkeit vom pH unbekannt und damit jede Korrektur ausgeschlossen. Wir verzichteten deshalb auf weitere Messungen.

Die experimentellen Fehler der Acetoacetyl-Enzymbestimmung lagen bei 5 %, verfälschen das Ergebnis also nicht wesentlich. Anzeichen einer unerwünschten Nebenreaktion des Acetoacetyl-Restes, etwa durch Kondensation mit Aminogruppen des Proteins, ergaben sich in einem Kontrollversuch nicht.

Eine, allerdings etwas willkürliche Abschätzung der Summe aller systematischen Fehler ergibt 30-50 %, entsprechend einer Änderung des freien Energieunterschiedes von 0.15-0.30 kcal.

Aus der ermittelten Gleichgewichtskonstante ist es nun grundsätzlich möglich, die freie Energie der Reaktion zu berechnen, wenn man die gemessene scheinbare (K'_{eq}) auf die wahre Gleichgewichtskonstante K_{eq} umrechnet. Es gilt für die Reaktion:



$$(Gl. 6) \quad K'_{eq} = \frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]}$$

$$(Gl. 7) \quad K_{eq} = \frac{[C] \cdot f_C \cdot [D] \cdot f_D}{[A] \cdot f_A \cdot [B] \cdot f_B} = \frac{f_C \cdot f_D}{f_A \cdot f_B} \cdot K'_{eq}$$

Für die Abschätzung von Aktivitätskoeffizienten (f) organischer Ionen hat KIELLAND (21) eine Näherungsformel angegeben:

$$(Gl. 8) \quad -\log f = \frac{0.5 \cdot z^2 \cdot \sqrt{\mu}}{1 + z \cdot \sqrt{\mu}}$$

wobei die Ionenstärke μ für den bei unseren Messungen verwendeten 0.1molaren Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 den Wert 0.187 annimmt (22) und z die Ionenwertigkeit des jeweiligen Reaktanten bedeutet.

Bei Anwendung von Gleichung 7 auf die Kondensationsreaktion:

$$K_{eq} = K'_{eq} \cdot \frac{f_{AcAcE} \cdot f_{CoASH}^2 \cdot f_{CO_2}}{f_{Enzym} \cdot f_{AcCoA} \cdot f_{MalCoA}}$$

erhält man

$$K_{eq} = K'_{eq} \cdot 6.53$$

wenn man den Bruch der Aktivitätskoeffizienten bildet und annimmt, daß Enzym und Acetoacetylenzym infolge gleicher Ladung auch den gleichen, unbekannten Aktivitätskoeffizienten besitzen.

Aus dem Wert von $K_{eq} = 1.28 \cdot 10^6$ berechnet sich die freie Energie der Reaktion zu:

$$\Delta F^0_{273} = -RT \cdot \ln K_{eq} = -7.60 (\pm 0.30) \text{ kcal}$$

Kombiniert man jetzt die Reaktionsgleichungen und freien Energien der Oxalacetat-Decarboxylase (4. 1. 1. 3) -Reaktion, der Methylmalonyl-CoA-Transcarboxylase (2. 1. 3. 1.) -Reaktion und der Thio1ase (2. 3. 1. 9.) -Reaktion zu einem Zyklus und setzt die thermodynamisch plausible Annahme, daß Malonyl-CoA und Acetyl-CoA in gleichen Reaktionen gleiche Änderungen ihres Energiegehaltes erfahren wie Methylmalonyl- bzw. Propionyl-CoA, so kann man die Änderung der freien Energie bei der Kondensationsreaktion voraussagen und mit dem experimentellen Wert vergleichen (Tabelle 3).

Tabelle 3 Reaktionszyklus zur Kondensationsreaktion

ΔF^0 [kcal]	Reaktion
-14.2	$\text{Oxalacetat}^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Pyruvat}^- + \text{CO}_2$
+0.39	$\text{Methylmalonyl-CoA}^- + \text{Pyruvat}^- \rightleftharpoons \text{Oxalacetat}^{2-} + \text{Propionyl-CoA}$
+5,30	$2 \text{ Acetyl-CoA} \rightleftharpoons \text{Acetoacetyl-CoA} + \text{CoASH}$
-8.51	$\text{H}^+ + \text{Malonyl-CoA} + \text{Acetyl-CoA} \rightleftharpoons \text{Acetoacetyl-CoA} + \text{CoASH}$ Substrahiert man von dieser Reaktionsgleichung die der Kondensationsreaktion, so erhält man:
+7.60 (± 0.3)	$\text{Acetoacetyl-Enzym} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{Acetyl-CoA} + \text{Malonyl-CoA}$ $\quad \quad \quad + \text{CoASH} \quad \quad \quad + \text{Enzym} + \text{H}^+$
-0.91 (± 0.3)	$\text{Acetoacetyl-Enzym} + \text{CoASH} \rightleftharpoons \text{Acetoacetyl-CoA} + \text{Enzym}$

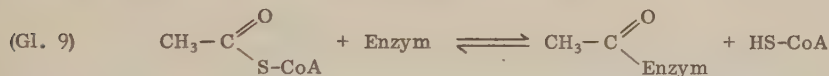
Als Ergebnis ist festzuhalten, daß der ermittelte Wert der Gleichgewichtskonstanten gut mit dem durch andere Messungen geforderten Wert übereinstimmt.

Weiterhin ist der letzten Zeile von Tabelle 3 zu entnehmen, daß der Acetoacetyl-Rest, wenn er am Enzym gebunden vorliegt, ein etwas höheres Energieniveau einnimmt als

er es im Acetoacetyl-Coenzym A besitzt. Da er nicht von Coenzym A auf das Enzym übertragen werden kann (vgl. S. 2), wurden, um diese Frage zu klären, auch die Gleichgewichtskonstanten der Beladungsreaktion mit Acetyl- bzw. Malonyl-CoA gemessen. In der ihnen zugehörigen freien Energieänderung muß der Betrag von +1 kcal zu finden sein, wenn er existent ist.

2. Die Acetylierungsreaktion

Die Reaktionsgleichung der Acetylierungsreaktion lautet:



Prinzipiell wurde für die Gleichgewichtsmessungen dieser Reaktion gleich verfahren wie bei den oben beschriebenen Messungen. Bei bekannten Konzentrationen von Acetyl-CoA, Coenzym A und Enzym wurde die Menge des gebildeten Acetyl-Enzyms gemessen. Hierzu wird nach Inkubation mit C^{14} -Acetyl-CoA das Protein der Lösung mit TCE ausgefällt, nach sorgfältigem Waschen in 1n KOH gelöst und seine Radioaktivität bestimmt. Als erstes wurde die Kinetik der Reaktion aufgenommen, um die für die Einstellung des Gleichgewichtes notwendige Zeit zu ermitteln (Abb. 17).

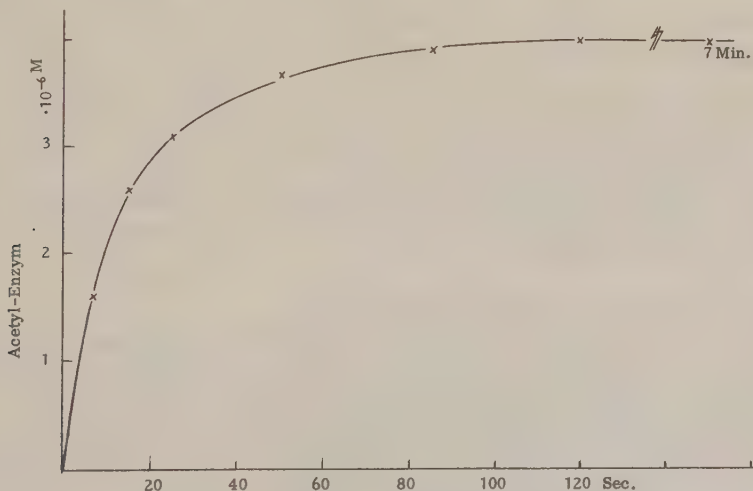


Abbildung 17 Zeitabhängigkeit für die Acetylierungsreaktion

M/10 KPO_4 pH 6.5; $5,22 \times 10^{-5} \text{ M}$ 1- C^{14} -Acetyl-CoA ($7,4 \times 10^6 \text{ IpM}/\mu\text{Mol}$); M/100 Cystein;
2,62 mg/ml Enzym (1100 mE/mg); T = 0°C ; V = 5,5 ml; zur Ausführung siehe exp. Teil S.123

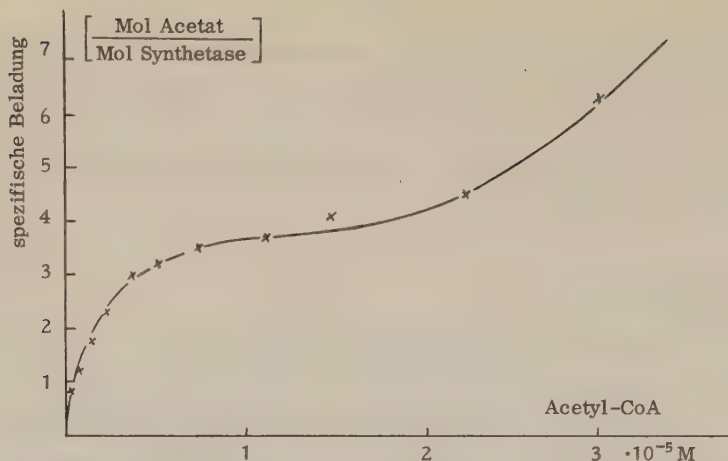


Abbildung 18 Acetylierung von Synthetase in Abhängigkeit von der Acetyl-CoA-Konzentration
M/10 KPO₄ pH 6.5; 1-C¹⁴-Acetyl-CoA (13 x 10⁶ IpM/μMol); M/100 Cystein; 1,55 mg/ml
Enzym (1000 mE/mg); T = 0°C; V = 0,65 ml; Aufarbeitung siehe Seite 123 (Protein 3x ge-
waschen)

Es wurde eine Inkubationszeit von 5 Minuten und wie für die Kondensationsreaktion 0°C als Temperatur gewählt. Die Acetatbeladung des Enzyms in Abhängigkeit von steigender Acetyl-CoA-Konzentration zeigt in Abbildung 18 nach einem Plateau bei etwa 3.4 (Mol Acetat/Mol Synthetase) einen deutlichen Anstieg. Auf eine Verunreinigung durch Reste der Inkubationslösung ist er nicht zurückzuführen. Andererseits zeigte eine mehrmalige Wiederholung der Versuche, daß mit zunehmender Anzahl der Waschvorgänge des denaturierten Proteins der zweite Anstieg zu höheren Acetyl-CoA-Konzentrationen hin verschoben und weniger steil wurde. Wir müssen daher annehmen, daß es sich um Adsorptionsphänomene von Acetyl-CoA an Synthetase handelt, die bei höheren Konzentrationen auftreten, oder um Okklusion von Acetyl-CoA bei der Denaturierung des Enzyms mit Trichloressigsäure.*)

Ein weiterer Versuch unterstützt diese Annahme:

Konstante Enzymmengen wurden mit steigenden Acetyl-CoA- und CoASH-Mengen im Verhältnis 1:1 versetzt und die proteingebundene Radioaktivität bestimmt (Abb. 19). Aufgrund des Massenwirkungsgesetzes für die Reaktion

$$(Gl. 10) \quad \frac{[\text{Acetyl-Enzym}] \cdot [\text{CoASH}]}{[\text{Enzym}] \cdot [\text{Acetyl-CoA}]} = K_{eq}$$

*) In den Versuchen von Abb. 18 war nicht mit unmarkiertem Acetyl-CoA nachgewaschen worden.

fordert man in diesem Versuch ab einer gewissen Reaktantenkonzentration Konstanz der gebildeten Acetyl-Enzymmenge (ab etwa Acetyl-CoA : Enzym = 20 : 1, gestrichelte Linie Abb. 19). Wir fanden jedoch, wie in Abbildung 19 gezeigt, steigende Acetat-Inkorporation weit über diese Grenze hinaus, was auf eine Nebenreaktion hindeutet.

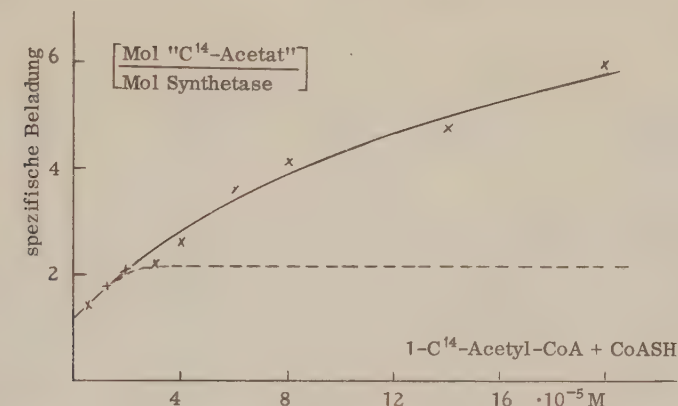


Abbildung 19 Einbau von Radioaktivität in Synthetase unter dem Einfluß steigender Mengen C¹⁴-Acetyl-CoA und CoASH im Verhältnis 1 : 1 Versuchsbedingungen und Aufarbeitung identisch wie in Abb.18.

Da sich zudem verschiedene Enzympräparate in der Beladungsreaktion bei höheren Acetyl-CoA-Konzentrationen nicht immer gleich verhielten, wurde für die Gleichgewichtsmessungen der Konzentrationsbereich der Reaktionspartner so gewählt, daß die entstehende Acetyl-Enzymkonzentration unter einer spezifischen Beladung von 3 lag.

Aufgrund später erwähnter Ergebnisse (S. 37) mußte angenommen werden, daß mindestens 3 Acceptorstellen in der Synthetase den Acetyl-Rest übernehmen können, d. h. für trimere Synthetase gilt:

$$(Gl. 11) \quad \text{Enzymkonzentration} = 9 \cdot \text{Proteinkonzentration}$$

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse unserer Messung zusammengefaßt. Versuchsweise wurde auch K_{eq} unter der Annahme berechnet, nur 3 Reste würden von der Synthetase gebunden. Man erhält dann einen Wert von 1.7. Beide Größen sind jedoch unwesentlich unterschieden von 1, einem Vorgang, der mit einer freien Energiedifferenz von 0 abläuft, wie man es bei Transacylierung zwischen gleichartigen Thiolen auch theoretisch erwartet.

Tabelle 4 Wertetabelle zur Gleichgewichtsmessung der Acetylierungsreaktion

Coenzym A μM	Acetyl-Enzym μM	Enzym μM	Acetyl-CoA μM	K_{eq} (0°C)
10.8	1.54	2.38	13.9	0.15
16.7	1.26	2.66	14.2	0.56
24.2	1.05	2.87	14.3	0.62
31.7	0.94	2.98	14.4	0.69
47.0	0.80	3.12	14.5	0.83
62.0	0.71	3.21	14.6	0.94
77.3	0.61	3.31	14.6	0.97
10.9	0.90	3.02	9.1	0.36
15.9	0.95	2.97	14.0	0.36
21.1	1.14	2.78	18.9	0.46
31.5	1.57	2.35	28.5	0.74
41.7	1.77	2.15	38.2	0.90
Mittelwert:				$0.63 = K_{eq}$

Eine Korrektur der Konzentration über die Aktivitätskoeffizienten ist in diesem Falle nicht nötig (vgl. S.19), da sie für CoASH und Acetyl-CoA den gleichen Faktor betragen und sich daher kürzen. Es gilt also:

$$K'_{eq} = K_{eq} = \frac{[\text{Acetyl-Enzym}][\text{CoASH}]}{[\text{Enzym}][\text{Acetyl-CoA}]} = 0.63 \pm 0.25 \text{ (0°C, pH 6.5)}$$

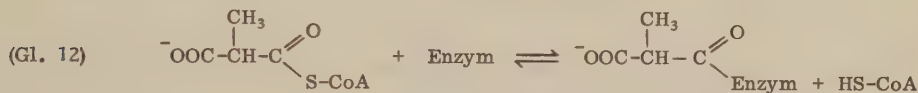
$$\Delta F_{273}^0 = -RT \cdot \ln K_{eq} = +0.25 \text{ kcal}$$

3. Die Methylmalonat-Beladungsreaktion

Um den auf Seite 20 besprochenen Kreisprozeß zu Ende zu führen, mußte auch die Freie Energie der Malonyl-Übertragungsreaktion von Coenzym A auf das Enzym gemessen werden.

Als Modell für Malonyl-CoA wurde Methylmalonyl-CoA gewählt, von dem bekannt war (23), daß es nicht zum Eingehen der Kondensationsreaktion befähigt ist, d.h., seine

Reaktion mit freiem Enzym streng auf die Transacylierungsreaktion (Gl. 12) beschränkt sein sollte, während man bei Malonyl-CoA mit Nebenreaktionen, die zur Bildung von Acetoacetyl-Enzym führen, und damit die Messung erschweren, zu rechnen hatte (siehe Abb. 20).



Die Versuchsanordnung der Messungen war exakt dieselbe wie für die Acetylierungsreaktion, ebenso wurde die Temperatur von 0°C eingehalten. Nach spätestens 5 Minuten befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht.

Tabelle 5 Wertetabelle zur Gleichgewichtsmessung der Methylmalonat-Beladungsreaktion

Coenzym A μM	Methylmalonyl- Enzym μM	Enzym μM	Methylmalonyl- Coenzym A μM	$K_{eq} \cdot 10^{+2} (0^\circ\text{C})$
30.6	0.66	11.34	79.0	2.26
31.0	1.00	11.00	158.0	1.78
31.2	1.20	10.80	237.0	1.45
31.3	1.34	10.73	316.0	1.23
31.5	1.53	10.47	395.0	1.17
10.8	0.86	11.14	25.0	3.24
11.3	1.29	10.71	50.0	2.72
11.8	1.77	10.23	100.0	2.04
12.6	2.62	9.38	200.0	1.76
13.3	3.34	8.66	300.0	2.35
200.0	0.47	5.53	790.0	2.15
10.6	0.47	5.53	196.5	1.28
30.4	0.44	5.56	196.6	1.98
70.2	0.27	5.73	196.7	1.68
100.2	0.27	5.73	196.7	2.39
6.1	1.16	4.84	194.0	0.95
11.0	1.02	4.98	194.0	1.15
15.8	0.87	5.13	194.2	1.38
20.8	0.79	5.21	194.2	1.63

Mittelwert: $1.82 \cdot 10^{-2} = K_{eq}$

Tabelle 5 faßt die Meßwerte zusammen, als Mittelwert erhielten wir:

$$K_{eq} = K'_{eq} = \frac{[\text{MeMal-Enzym}] [\text{CoASH}]}{[\text{Enzym}] [\text{MeMal-CoA}]} = 0.018 \pm 0.008 (0^\circ\text{C}, \text{pH } 6.5)$$

Als Annahme für die Berechnung liegt die Besetzung von zwei verschiedenen Acceptorstellen der Synthetase zugrunde, was zur Beziehung

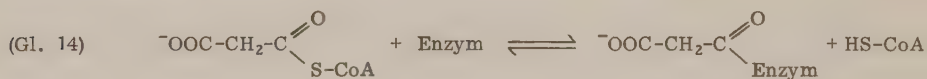
$$(Gl. 13) \quad \text{Enzymkonzentration} = 6 \cdot \text{Proteinkonzentration}$$

führt. Die Versuche in Kapitel III geben eine Begründung für diese Annahme.

Das Ergebnis der Messung überraschte insofern, als einem Gleichgewicht mit $K = 0.018$ ein positiver ΔF -Betrag von 2.17 kcal entspricht, d.h. der Methylmalonyl-Rest am Enzym in einer um diesen Betrag energiereicheren Bindung vorliegt als am Coenzym A. Für Transacylierungen zwischen Thiolen war jedoch, wie beim Acetat auch gefunden, ein Wert für ΔF um 0, d.h. ein Gleichgewicht um 1 zu erwarten. Wir vermuteten daher, daß sich Methylmalonyl-CoA vielleicht nicht völlig substratanalog, also wie Malonyl-CoA verhielt und versuchten die Gleichgewichtskonstante der Malonyl-Beladungsreaktion zu messen.

4. Malonat-Beladungsreaktion

Bei der Reaktion:



deren Gleichgewicht grundsätzlich nach der gleichen Methode wie unter 2. und 3. gemessen wird, tritt als langsame Nebenreaktion Decarboxylierung des Malonyl-Restes ein (Reaktion II in Abb. 20), die nach dem in Abbildung 20 wiedergegebenen hypothetischen Mechanismus zu einem Acetoacetyl-Rest an der "zentralen" SH-Gruppe führt.

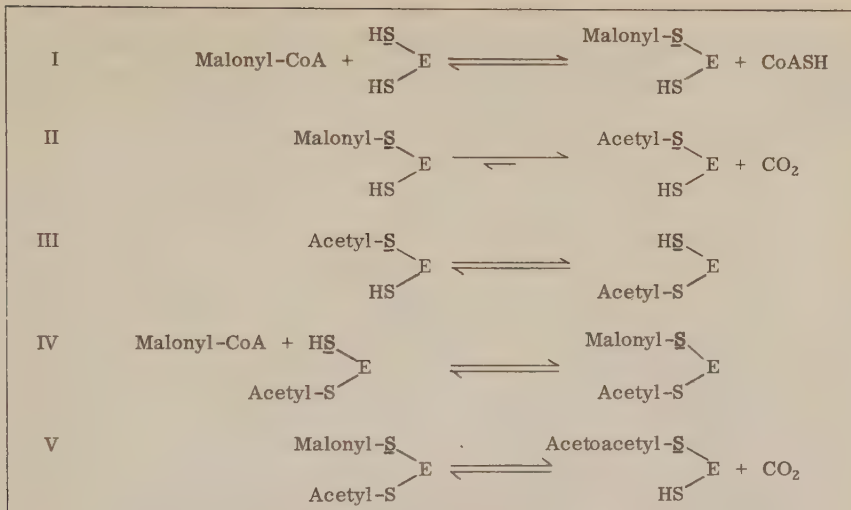


Abbildung 20 Nebenreaktion der Malonyl-Beladung von Synthetase
(vgl. Abb. 2 für Fett- und Normaldruck)

Bis auf Reaktion II handelt es sich um die Reaktionen, die von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA zu den Fettsäuren führen (siehe Reaktionsschema Einleitung). Reaktion II stellt ein Modell der Kondensationsreaktion dar, in dem statt eines Acyl-Kations das Proton der Reaktionspartner des Malonyl-Restes ist. Eine Weiterreaktion des Acetoacetyl-Enzyms kann in Abwesenheit von NADPH, sieht man von der auf Seite 6 beschriebenen langsamen Acetoacetyl-Enzymhydrolyse ab, nicht erfolgen.*)

Um das Gleichgewicht von Reaktion I zu messen, mußte

1. neben 1-C¹⁴-Malonyl-Enzym auch das Acetoacetyl-Enzym über sein 2-C¹⁴-Aceton-2,4-Dinitrophenylhydrazon bestimmt werden und seine Konzentration von der des 1-C¹⁴-Malonyl-Enzyms abgezogen werden;
2. die totale Enzymkonzentration um den Betrag des Acetoacetyl-Enzyms gekürzt werden.

*) Es findet zwar eine zweite, in Abbildung 20 noch nicht aufgeführte Nebenreaktion zu Triacetolacton statt (vgl. Abb. 26), die jedoch die Konzentration der freien "zentralen" SH-Gruppe nicht beeinträchtigt und für die Gleichgewichts-Messung daher praktisch keine Rolle spielt.

Der Zeitbedarf für die Gleichgewichtseinstellung ist gleich dem von Reaktion 12.

Abbildung 21 zeigt eine typische Meßreihe für die Malonyl-Enzymbildung bei gleichzeitiger Analyse von entstandenem Acetoacetyl-Enzym.

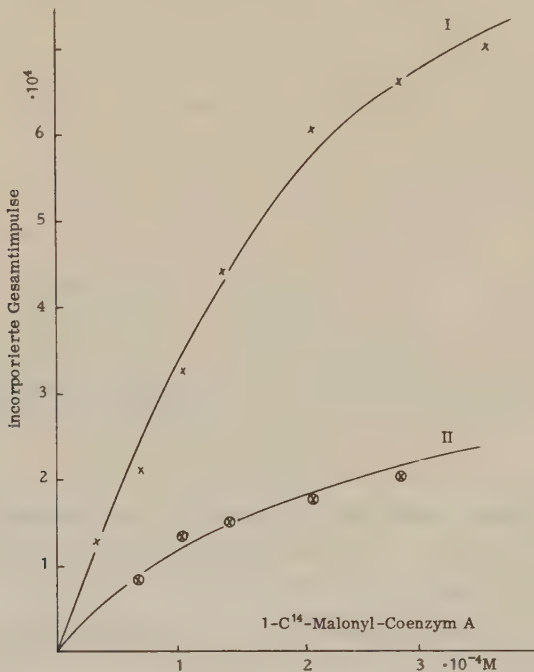


Abbildung 21 Malonyl-Enzymbildung in Abhängigkeit von der Malonyl-CoA-Konzentration

I: Radioaktivität am Protein

II: Radioaktivität im Aceton-2,4-Dinitrophenylhydrazon

Jeder Meßpunkt: M/10 KPO₄ pH 6,5; 1-C¹⁴-Malonyl-CoA (13 x 10⁶ IpM/μMol); M/100 Cystein; 2,3 mg/ml Enzym (800 mE/mg); 3 x 10⁻⁵ M CoASH; T = 0°C; V = 1 ml;

Ausführung s. exp. Teil Seite 123

Für die Tabelle 6 wurde wieder die Beziehung:

(Gl. 15) Enzymkonzentration = 6 · Proteinkonzentration (vgl. Gl. 11, 13)

angenommen.

Tabelle 6 Wertetabelle zur Gleichgewichtsmessung der Malonat-Beladungsreaktion

Coenzym A μM	Malonyl-Enzym μM	Enzym μM	Malonyl-CoA μM	K _{eq} (0°C)
31.2	0.45	5.22	33.4	0.08
32.1	0.96	4.45	67.1	0.10
33.0	1.27	3.84	100.7	0.10
34.9	1.59	3.30	134.5	0.12
35.2	2.04	2.44	202.4	0.14
36.0	2.65	1.70	272.8	0.20
36.4	2.70	1.45	339.6	0.20
25.6	2.60	2.10	167.8	0.19
44.5	1.90	2.80	168.5	0.18
64.1	1.70	2.94	168.9	0.16
103.6	1.36	3.54	169.5	0.23
153.2	1.10	3.86	169.8	0.26
202.2	0.82	4.18	170.2	0.23

Mittelwert: 0,168 = K_{eq}

Als Mittelwert unserer Messungen erhielten wir:

$$K_{eq} = K'_{eq} = \frac{[\text{Malonyl-Enzym}] [\text{CoASH}]}{[\text{Enzym}] [\text{Malonyl-CoA}]} = 0,168 \pm 0,09 (0^\circ\text{C}; \text{pH } 6,5)$$

Dies entspricht einer freien Energieänderung von

$$\Delta F^0_{273} = -RT \cdot \ln K_{eq} = +0,96 \text{ kcal,}$$

einem Wert, der sich deutlich von der freien Energieänderung der Methylmalonat-Beladungsreaktion, aber auch von der der Acetylierungsreaktion unterscheidet.

Das vollständige Energieschema für die Kondensationsreaktion ist nun in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7 Energieschema der Kondensationsreaktion *)

ΔF^0 [kcal]	Reaktion
± 0	Acetyl-CoA + Enzym $\rightleftharpoons$ Acetyl-Enzym + CoASH
+0.96	Malonyl-CoA + Acetyl-Enzym $\rightleftharpoons$ $\begin{matrix} \text{(Malonyl)} \\ \text{(Acetyl)} \end{matrix} \text{Enzym} + \text{CoASH}$
+7.60	Acetoacetyl-Enzym + CO ₂ $\rightleftharpoons$ Acetyl-CoA + Malonyl-CoA + 2 CoASH + Enzym + H ⁺
+8.56	Acetoacetyl-Enzym + CO ₂ $\rightleftharpoons$ $\begin{matrix} \text{(Malonyl)} \\ \text{(Acetyl)} \end{matrix} \text{Enzym}$

(Der Fehler aller Messungen liegt innerhalb ± 0.30 kcal)

Man entnimmt ihm folgendes Ergebnis:

1. Als freie Energieänderung hatte sich für die Reaktion:



ein Wert von -8.51 kcal voraussagen lassen (Tabelle 3). Vergleicht man damit den Wert von -8.56 kcal der freien Energieänderung aus Tabelle 7, wenn die Reaktion an einem Enzym-Thioester statt einem Coenzym A-Thioester abläuft, findet man gute Übereinstimmung

2. Der Acetoacetat-Rest nimmt am Enzym vermutlich ein um 0.96 kcal höheres Energieniveau als im Coenzym A ein.

*) In Tabelle 7 ist eine experimentell nicht vermeidbare Inkorrektheit enthalten, indem die Gleichgewichtskonstante der Malonatbeladung für Acetyl-Enzym und Enzym gleichgesetzt ist.

III. ZUR VERTEILUNG DER ACYL-RESTE AUF DIE SUBSTRATBINDUNGSSTELLEN DER SYNTHETASE

Nach dem von LYNEN für die Fettsäuresynthese vorgeschlagenen Mechanismus (vgl. Abb. 2) erwartet man die bevorzugte Beladung der "zentralen" SH-Gruppe durch den Methylmalonat- bzw. Malonat-Rest und die der "peripheren" SH-Gruppe durch den Acetat-Rest. Die Befunde von SCHWEIZER und HAGEN (16, 17) hatten die Verteilung der Acyl-Reste auf zwei verschiedene SH-Gruppen bewiesen, ebenso deren selektive Hemmbarkeit durch Jodacetamid und N-Äthyl-Maleinimid. Sie hatten weiter nahegelegt, daß die Übertragung des Malonyl-Restes von Coenzym A auf das Enzym durch eine Transferase katalysiert wird, die der n-Acyl-Reste durch eine zweite. Es mußte nun geprüft werden, ob die Transferasen des Multienzym-Komplexes die Acyl-Reste intermediär in kovalenter Bindung übernehmen und wenn ja, ob die Acceptorgruppen ebenfalls Thiol-Natur besitzen. Weiter war die erwähnte Verteilung der Acyl-Reste im Sinn des Mechanismus von LYNEN noch unbewiesen und die chemische Natur der "zentralen" SH-Gruppe unbekannt. Die "periphere" SH-Gruppe hatte HAGEN (16) mit der SH-Gruppe eines Cysteinbausteines identifiziert. Die zur weiteren Behandlung dieser Probleme benutzten Methoden waren im wesentlichen vier:

1. Das Messen des Thioester-Anteiles der verschiedenen Acyl-Synthetasen durch Peroxidation mit Perameisensäure nach der Methode von HARRIS (24), bei der nach der Reaktionsgleichung:



Thioester zur entsprechenden Sulfonsäure unter Freisetzung der Carbonsäure umgewandelt werden. Durch Messen der am Protein nach Beladen mit C¹⁴-Acyl-CoA und Peroxidation verbliebenen Radioaktivität kann so der Thioester-Anteil bestimmt werden.

2. Die Anwendung der kinetischen Analyse durch Einsetzen von Konkurrenzsubstraten oder kompetitiven Hemmstoffen in die Fettsäuresynthese.
3. Die konkurrierende Beladung des Enzyms mit C¹⁴-Acyl-Resten bzw. das Beladen mit diesen Acyl-Resten nach Einwirken von SH-Reagenzien.
4. Die Peptidanalyse, d.h. die Charakterisierung einzelner Acyl-Peptide nach proteolytischem Abbau von Acyl-Synthetase.

1. Thioesteranalyse

a) Acetyl-Enzym

Wir begannen mit der Analyse des Acetyl-Enzyms aus methodischen Gründen, da hier die Originalvorschrift von HARRIS angewendet werden konnte. 1-C^{14} -Acetyl-Synthetase, in Ameisensäure gelöst, wurde auf Papierstreifen aufgetragen, in einem evakuierten Exsiccator Dämpfen von Perameisensäure ausgesetzt, nach vier Stunden diese Streifen in einem Exsiccator über KOH von freigesetzter C^{14} -Essigsäure befreit und die am Streifen verbliebene Radioaktivität unter Scintillationslösung (Toluol) gemessen. Abbildung 22 zeigt das Ergebnis eines typischen Versuchs, der beweist, daß der Acetat-Rest nicht ausschließlich an SH-Gruppen des Enzyms gebunden wird.

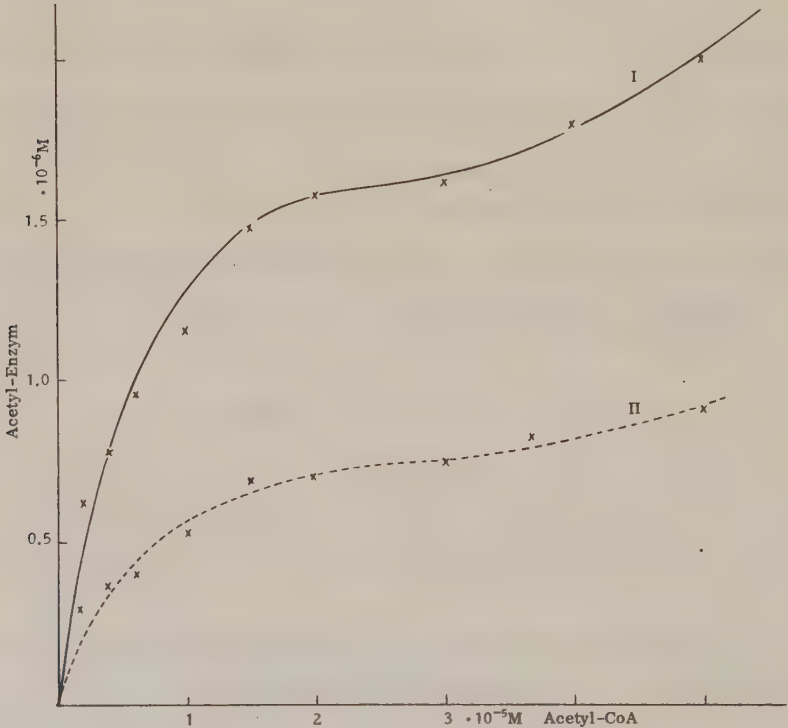


Abbildung 22 Peroxidation von Acetyl-Synthetase;

I Kontrollkurve ohne Perameisensäure II wie I, nach PAS-Behandlung
 Jeder Meßpunkt: $\text{M}/10 \text{ KPO}_4$ pH 6.5; 1-C^{14} -Acetyl-CoA ($24.8 \cdot 10^6 \text{ IpM}/\mu\text{Mol}$);
 2 mg/ml Enzym (850 mE/mg); $T = 0^\circ\text{C}$; $V = 1 \text{ ml}$; Ausführung s. exp. Teil S. 127

Alle Bemühungen, die auf dem Verdacht basierten, daß es sich bei dem Ergebnis um unvollständige Oxidation handele, ergaben trotz mehrfacher Wiederholung und Anwendung anderer Methoden dasselbe Bild. Oxidiert man Acetyl-Synthetase in Perameisensäurelösung und entfernt nach Auftragen auf Papier die Essigsäure durch mehrfaches Eindampfen mit Ameisensäure oder gewinnt das Acyl-Protein aus der Lösung durch Ausfällen mit Äther wieder, so mißt man immer einen Restbetrag von durchschnittlich 50 % verbliebener Radioaktivität (wie in Abb. 22). Ebenso hat längeres Einwirken der Perameisensäure keinen Einfluß auf das Ergebnis. Es muß sich also bei der Acetyl-Synthetase um ein Gemisch aus Thioester und Nicht-Thioester handeln, da man nicht annehmen kann, daß sich der Nicht-Thioesteranteil als Artefakt bei der Proteindenaturierung bildet (vgl. S. 44).

b) Methylmalonyl-Enzym

Um nach Oxidation von C^{14} -Methylmalonyl-Enzym die freie C^{14} -Methylmalonsäure aus dem Gemisch abzutrennen, wurden Aliquote des in Lösung oxidierten Acyl-Proteins auf Whatman-I-Papierbogen aufgebracht, der Elektrophorese unterworfen und die Startflecken, die unverändertes C^{14} -Acyl-Protein enthalten, unter Scintillationslösung (Toluol) gezählt. Das Ergebnis (Abb. 23) verblüffte noch mehr als das für den Acetat-Rest, denn es zeigte, daß bis auf einen geringen Prozentsatz von 5-10 % keine freie Methylmalonsäure entstanden war.

Merkwürdigerweise konnte ein Teil des Methylmalonyl-Enzyms oxidiert werden, wenn das gewaschene trockene Acyl-Enzym durch Behandeln mit Diazomethan zuvor methyliert worden war. Wir können zur Zeit keine Erklärung für dieses Phänomen geben. Daß Methylmalonsäure elektrophoretisch von denaturierter Synthetase bei pH 6.2 abgetrennt werden kann, ergab der Blindversuch mit oxidiertem Methylmalonyl-CoA.

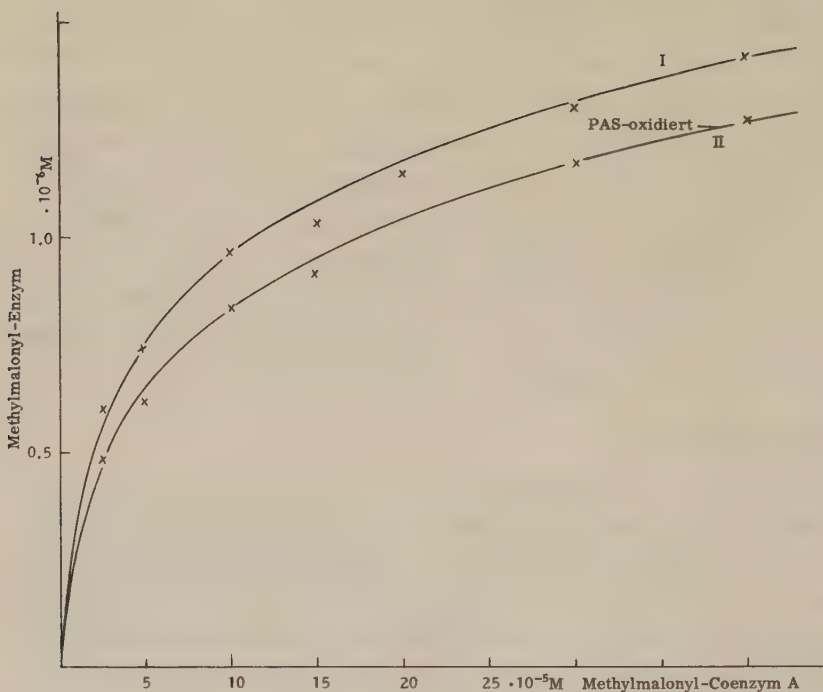


Abbildung 23 Peroxidation von Methylmalonyl-Synthetase

I Kontrollkurve ohne Perameisensäure II wie I, nach PAS-Behandlung
 Jeder Meßpunkt: $M/10 KPO_4$ pH 6.5; $3-C^{14}$ -Methylmalonyl-CoA ($20.4 \cdot 10^6$ IpM/ μ Mol);
 2 mg/ml Enzym (850 mE/mg); $T = 0^\circ C$; $V = 1$ ml; Ausführung s. exp. Teil S. 127

c) Malonyl-Enzym

Die Methodik der Malonyl-Enzym-Oxidation war dieselbe wie unter b). Es besteht hier allerdings die Notwendigkeit der Korrektur durch die Menge des gebildeten Acetoacetyl-Enzyms, wie sie schon für die Gleichgewichtsmessung auf Seite 27 angebracht worden war. Außerdem wurde in einem weiteren Versuch $3-C^{14}$ -Malonyl-CoA eingesetzt, bei dessen "Selbstkondensation" ein nicht radioaktiver Acetoacetat-Rest entsteht.

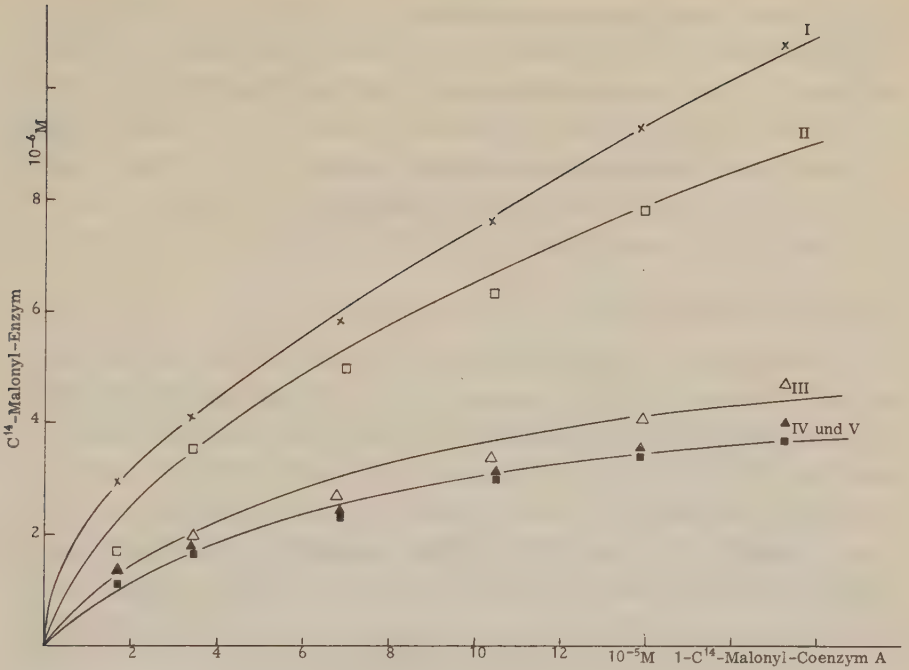


Abbildung 24 Nachweis von Malonyl-Enzym als Thioester und Hemmung seiner Entstehung durch NÄM

Jeder Meßpunkt: M/10 KPO_4 pH 6.5; $1-C^{14}$ -Malonyl-CoA ($13 \cdot 10^6$ IpM/ μ Mol); 4.6 mg/ml Enzym (600 mE/mg); $T = 0^\circ C$; $V = 1$ ml; zur Ausführung s. exp. Teil S. 127

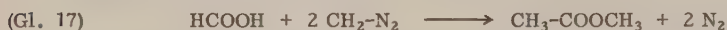
- I: = Malonyl-Enzym ohne Korrektur
- II: = I unter Abzug gebildeten Acetoacetyl-Enzyms
- III: = PAS-stabile Radioaktivität
- IV: = Malonyl-Enzymbildung nach NÄM-Einwirkung
- V: = IV nach PAS-Oxidation

Das Ergebnis (Abb. 24) zeigte in beiden Fällen klar, daß, wie nach LYNENs Hypothese gefordert, der Malonat-Rest - zu etwa 50 % - an ein Schwefelatom des Enzymproteins gebunden ist. Aus den Kurven IV und V geht außerdem hervor, daß NÄM die Bildung dieses Thioesters unterbindet, ein erster Hinweis auf die Hemmung der "zentralen" SH-Gruppe durch NÄM. Dieses Ergebnis stützte uns in dem Verdacht, daß, wie schon aus den Gleichgewichtsmessungen zu entnehmen war (vgl. S. 29), sich der Methylmalonat-Rest in den Beladungsreaktionen nicht identisch dem Malonat-Rest verhält.

Weiterhin war zu fordern, daß es an der Synthetase eine (oder mehrere) Acceptorstellen geben muß, die die Acyl-Reste in nicht-Thioester-artiger Bindung übernehmen und denen der Name X-Gruppe gegeben wurde. E. SCHWEIZER unterstützte diese Befunde beweisend durch proteolytischen Abbau von C¹⁴-Malonyl-Enzym mit Pepsin und Chromatographie des Peptidgemisches an DEAE-Sephadex. Er fand eine Auftrennung in Peptide, die nicht oxidierbar waren und ein Peptid, welches zu 100 % durch Perameisensäure oxidiert werden konnte (in 25).

d) Acetoacetyl-Enzym

Für das Acetoacetyl-Enzym konnte die Thioesteranalyse nicht unmittelbar angewendet werden, da die Acetessigsäure und ihre Ester als Ketoverbindungen mit Perameisensäure eine Baeyer-Villiger-Reaktion eingehen. Es wurde deshalb das Acetoacetyl-Enzym unter Zusatz von S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin nach LYNNEN (14) mit Boranat zum β -Hydroxybutyryl-Enzym reduziert und dieses der Oxidation unterworfen. Durch Zugabe von Äther wird das Protein aus der Lösung entfernt und die ätherische Lösung nach Trocknen mit einem Überschuß Diazomethan versetzt. Es entsteht aus der β -Hydroxybuttersäure ihr Methylester, die Ameisensäure wird durch zweifache Reaktion mit Diazomethan in Essigester umgewandelt:



Der Äther wird bei Zimmertemperatur abgezogen und Aliquote der Essigesterlösung gaschromatographisch analysiert (nähere Einzelheiten s. exp. Teil).

Das abgetrennte Protein wurde nach alkalischer Hydrolyse mit β -Hydroxybuttersäure versetzt, die angesäuerte Lösung mit Äther perforiert und die ätherische Lösung nach Trocknen mit einem Überschuß Diazomethan versetzt und ebenfalls gaschromatographisch analysiert. Das Ergebnis des Versuchs zeigte, daß mehr als 90 % des Acetoacetyl-Enzyms oxidierbar, d.h. schwefelgebunden in der Synthetase vorliegen. Versuche von CHAN (29), in denen der Thioestergehalt von Acyl-Synthetase durch katalytische reduktive Spaltung der Thioester zu den Alkoholen gemessen wurde, stimmen mit den geschilderten Oxidationsversuchen überein.

SCHWEIZER (in 25) konnte nach peptischer Spaltung von Methylmalonyl-Enzym zwei X-Peptide, ein Pentapeptid und ein Heptapeptid isolieren, die von der gleichen Peptidkette stammen und außer Serin und Histidin nur aliphatische Aminosäureseitenketten

tragen, so daß als Träger des Acyl-Restes offenbar nur Serin in Frage kommt. Identische Peptide lieferte die Spaltung von Malonyl-Enzym (vgl. S. 36). Er stellte weiter fest, daß der Methylmalonyl-Rest in einer labileren Bindung vorlag als am Methylmalonyl-CoA, indem er die Halbwertszeiten der alkalischen Hydrolyse beider Substanzen verglich (26). Man muß zur Erklärung dieser Tatsache wohl annehmen, daß der Imidazol-Ring des Histidin-Restes die Hydrolyse des Serinesters beschleunigt, wie dies aus der Literatur bekannt ist (27).

Vor der Schilderung weiterer Versuche sei das bisherige Ergebnis festgehalten:

Der Acetat-Rest besetzt die "periphere" und eventuell die "zentrale" SH-Gruppe, außerdem Nicht-Thioestergruppen.

Die "zentrale" SH-Gruppe - eine Beladung der "peripheren" SH-Gruppe durch den Malonat-Rest ist nach allen bekannten Versuchen ausgeschlossen (vgl. S. 71) - und die X-Gruppe werden vom Malonat-Rest besetzt, während der Methylmalonat-Rest unter den angewendeten Versuchsbedingungen zu mehr als 90 % die X-Gruppe belädt. Weiterhin entsteht der Acetoacetat-Rest am Enzym fast ausschließlich als Thioester.

In Abbildung 25 ist ein Schema der Beladungsreaktionen gezeigt, welches den geschilderten Ergebnissen Rechnung trägt und durch weitere Versuche (II, 2-4) gerechtfertigt werden wird.

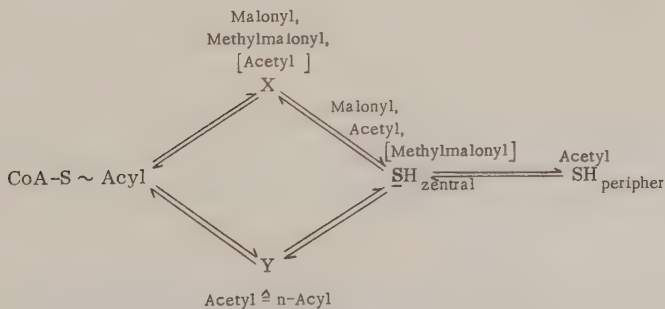


Abbildung 25 Schema der Beladungsreaktionen an der Synthetase

Nach diesem Schema ist die X-Gruppe Bestandteil der Malonyltransferase, die den Malonyl-Rest von Coenzym A auf die "zentrale" SH-Gruppe überträgt, die Y-Gruppe Bestandteil der n-Acyltransferase, die Gleiches für den n-Acyl-Rest bewirkt. Die Klammern in Abbildung 25 um den Acetyl-Rest an der X-Gruppe und den Methylmalonyl-Rest an der "zentralen" SH-Gruppe sollen die geringe Besetzung durch diese Reste verdeutlichen. Nur der Acetyl-Rest gelangt von der "zentralen" zur "peripheren" SH-Gruppe. Im Zuge der Kondensation mit dem Malonyl-Thioester verläßt der Acetyl-Rest die "periphere" SH-Gruppe. Während nun in Gegenwart von NADPH die Fettsäuresynthese gemäß Abbildung 2 ihren Verlauf nimmt, bestehen in Abwesenheit von NADPH für den an der "zentralen" SH-Gruppe gebildeten Acetoacetyl-Rest zwei Möglichkeiten der Weiterreaktion, die in Abbildung 26 skizziert sind.

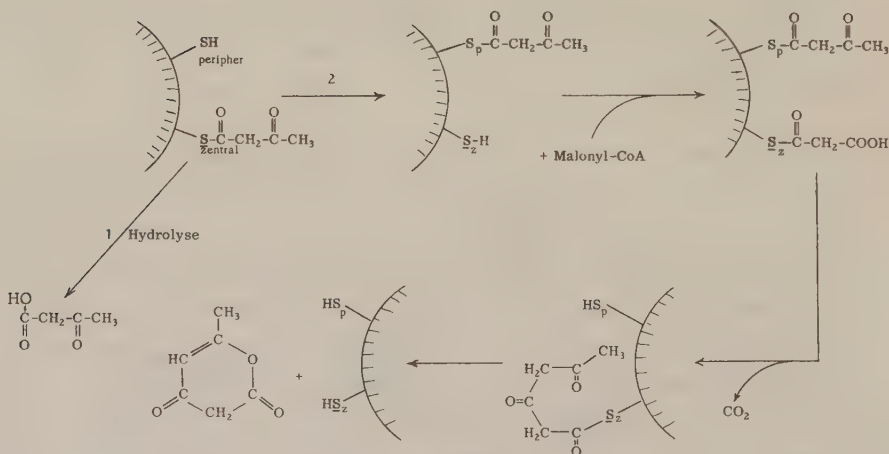


Abbildung 26 Nebenreaktionen des Acetoacetyl-Enzyms

- 1 Spontanhydrolyse
- 2 Triacetolactonbildung

Der erste Weg ist die auf Seite 6 besprochene Spontanhydrolyse des Acetoacetyl-Enzyms. Den zweiten Weg, die Bildung von Triacetolacton, bewiesen Versuche von YALPANI und WILLECKE (28). Der in Abbildung 26 gezeigte Mechanismus seiner Entstehung ist noch hypothetisch, wenn auch sehr wahrscheinlich. Das Triacetolacton ist die Substanz X, mit einer UV-Absorption bei 278 m μ , die LYNNEN als Folgeprodukt von Acetoacetyl-Enzym in Abwesenheit von NADPH beobachtet hatte (23).

2. Kinetische Analyse

Um weitere Anhaltspunkte zu gewinnen, untersuchten wir die bereits bekannte Hemmung der Fettsäuresynthese durch Methylmalonyl-CoA quantitativ (23). Aus Abbildung 27 ersieht man die Konkurrenz der Hemmung.

Die Tabelle B (Abb. 27) zeigt in Spalte 3 die errechneten Inhibitorkonstanten. Ihrem Anstieg mit der Methylmalonyl-CoA-Konzentration läßt sich entnehmen, daß nicht reine Konkurrenz vorliegt, für die Konstanz der Werte gefordert wird. Man kann jedoch qualitativ schließen, daß dem Malonat-Rest eine Bindungsstelle offensteht, die nicht identisch vom Methylmalonat-Rest besetzt werden kann, d.h. die "zentrale" SH-Gruppe (vgl. Abb. 25).

Eine zweite Möglichkeit der kinetischen Konkurrenz bieten Malonyl-CoA und Acetyl-CoA für den Fall, daß der Acetat-Rest intermediär auch auf die "zentrale" SH-Gruppe gelangen kann, wie dies im Schema in Abbildung 25 gefordert wird. Mißt man die Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese im optischen Test bei 90 % Sättigungskonzentration von Malonyl-CoA und steigender Acetyl-CoA-Konzentration, so erwartet man im Falle einer Konkurrenz zunächst steigende Geschwindigkeit bis zum Scheitelpunkt bei 90 % maximaler Geschwindigkeit, dann aber sinkende Geschwindigkeit, da jetzt die Malonat-Konzentration an der "zentralen" SH-Gruppe immer mehr abnimmt und die Kondensation (geschwindigkeitsbestimmender Schritt (!); vgl. S.8-14) langsamer wird.

Abbildung 28 belegt, daß dieser Fall zutrifft, der Acetat-Rest also auch als Thioester der "zentralen" SH-Gruppe zu erwarten ist.

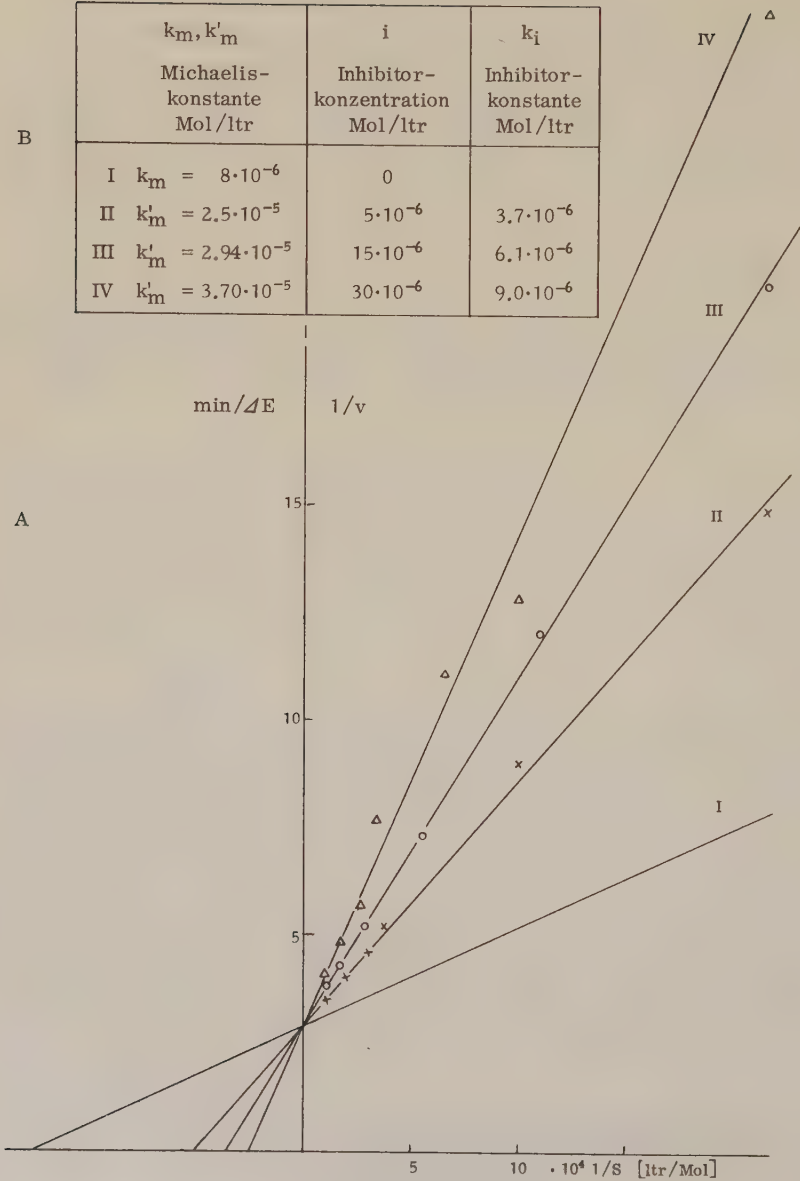


Abbildung 27 Hemmung der Fettsäuresynthese durch Methylmalonyl-CoA

A; Lineweaver-Burk-Diagramme; B; Wertetabelle; Ausführung expt. Teil S. 121

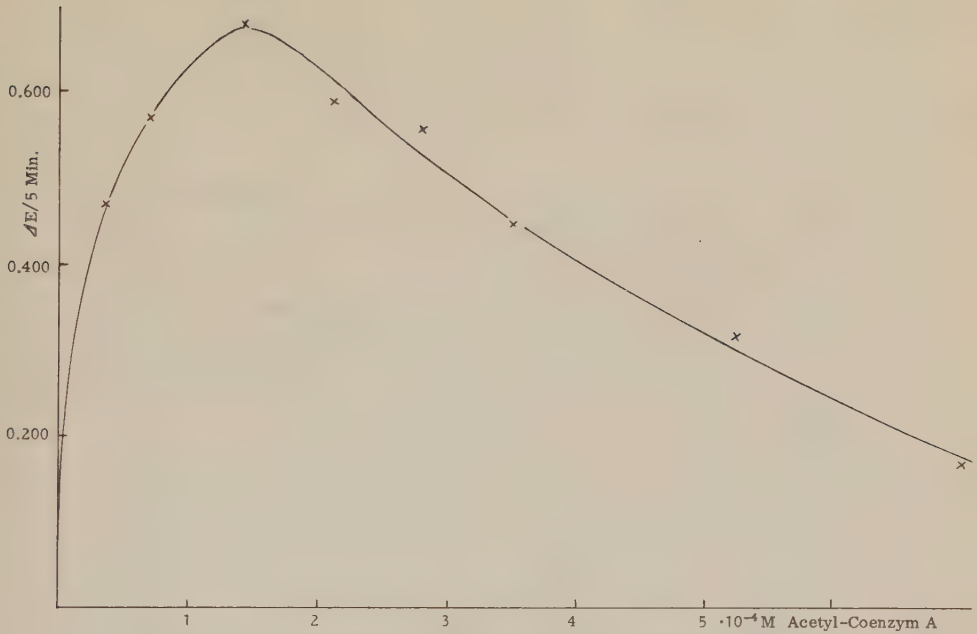


Abbildung 28 Die Acetat-Malonat-Konkurrenz in der Fettsäuresynthese

Jeder Meßpunkt: $5 \cdot 10^{-5}$ M Malonyl-CoA. Durch freies Coenzym A verursachte Hemmung experimentell unter 2%; Ausführung s. exp. Teil S. 121

3. Beladung des Enzyms durch Acyl-Reste

a) Beladungskonkurrenz

SCHWEIZER hatte durch Vergleich der DEAE-Sephadex-Chromatographie des peptischen Hydrolysates von C^{14} -Methylmalonyl-Synthetase, die ohne und mit gleichzeitiger Inkubation von Acetyl-CoA aus Enzym und Methylmalonyl-CoA gebildet worden war, gezeigt, daß beide Reste um die "zentrale" SH-Gruppe des Enzyms konkurrieren (26). Für die Malonat-Methylmalonat-Konkurrenz wählten wir folgende Versuchsanordnung:

Radioaktives Methylmalonyl-CoA wurde mit Malonyl-CoA im molaren Verhältnis 1:1 in steigender Menge mit Synthetase inkubiert und die Protein-gebundene Radioaktivität gemessen (Abb. 29 II). Als Vergleichskurve ist in Abbildung 29 die Inkorporation von Methylmalonyl-CoA allein wiedergegeben (Abb. 29 I).

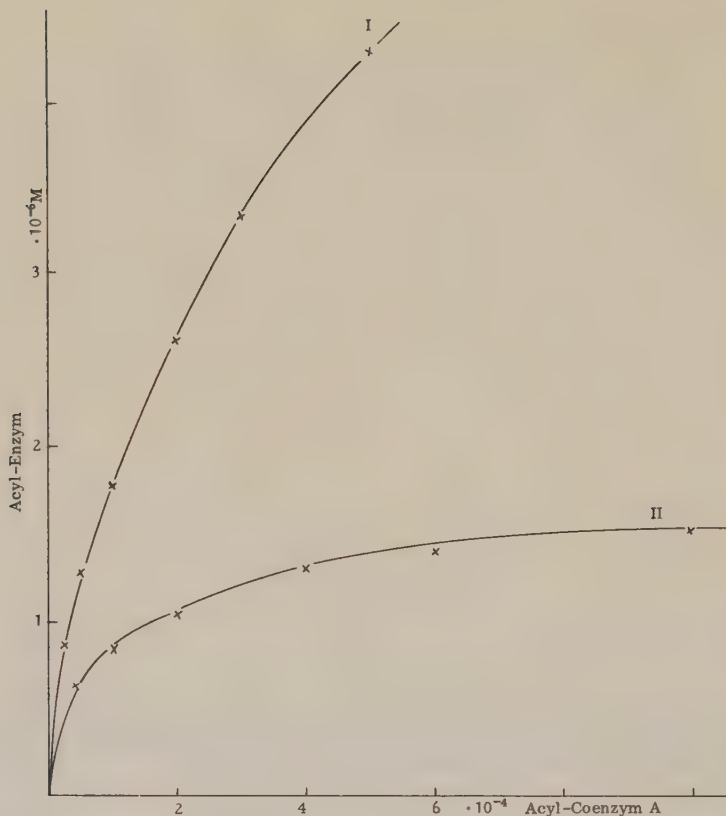


Abbildung 29 Konkurrenz von Malonyl- und Methylmalonyl-CoA in der Beladungsreaktion

I: Einbau von 3-C¹⁴-Methylmalonyl-CoA

II: Einbau einer Mischung Malonyl-CoA: 3-C¹⁴-Methylmalonyl-CoA = 1:1

Jeder Meßpunkt: M/10 KPO₄ pH 6,5; M/100 Cystein; 3-C¹⁴-Methylmalonyl-CoA ($20.4 \cdot 10^6$ IpM/ μ Mol); 4.6 mg/ml Enzym (700 mE/mg); T = 0°C; V = 1 ml; Ausführung s. exp. Teil S. 123

Für den Fall identischer Besetzung der X-Gruppe wie der "zentralen" SH-Gruppe durch den Malonat- wie Methylmalonat-Rest würde Kurve II in exakt halber Höhe von Kurve I verlaufen, gemäß der halben spezifischen Radioaktivität des Gemisches. Eindeutig geschieht dies nicht. Kurve II läuft in maximale Beladung bei etwa 32 000 inkorporierten Impulsen aus, entsprechend einer spezifischen Beladung von 0.8 Resten

Methylmalonat pro Enzymmolekel. Nimmt man wie in Gleichung 13 bzw. 15 an, daß jede Enzymmolekel grundsätzlich 6 Acyl-Reste (Malonat- oder Methylmalonat) binden kann, so findet man also im Falle einer Konkurrenz bei gleichen Acyl-CoA-Konzentrationen 0.8 Methylmalonyl-Reste und 5.2 Malonyl-Reste am Enzym. Dieses Verhältnis steht in guter Übereinstimmung mit den gemessenen Gleichgewichtskonstanten (0.018 bzw. bzw. 0.16).

Eine weitere Aussage über die Beladung der "zentralen" SH-Gruppe durch Methylmalonyl-CoA mußte der Vergleich der Methylmalonat-Beladung von Enzym und Acetoacetyl-Enzym, in dem die "zentrale" SH-Gruppe nicht frei vorliegt, bringen. Acetoacetyl-Enzym wird experimentell durch Inkubation von Malonyl-CoA, Acetyl-CoA und Enzym erzeugt. Gibt man nach zwei Minuten zur Mischung steigende Mengen Methylmalonyl-CoA, so erhält man die Beladungskurve II in Abbildung 30.

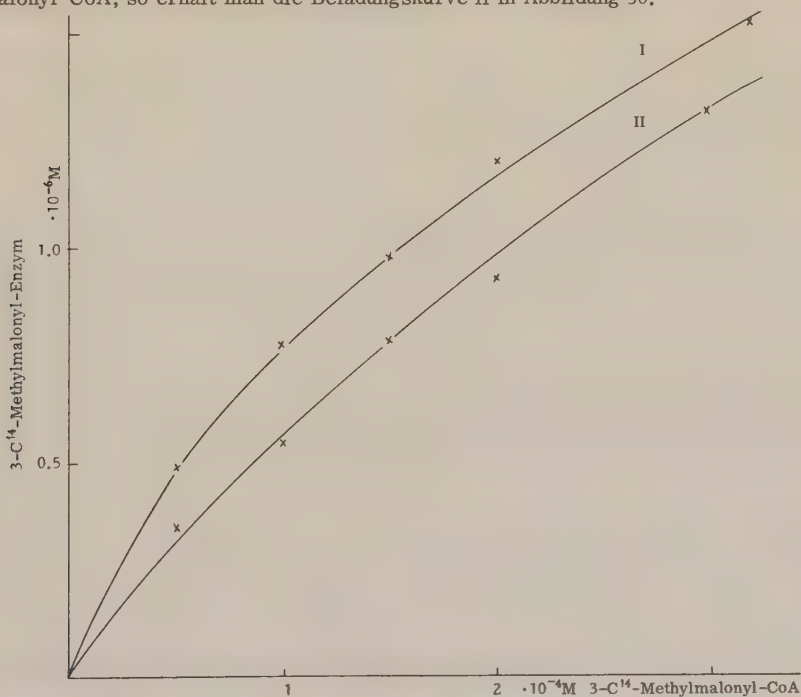


Abbildung 30 Beladung von Acetoacetyl-Enzym durch Methylmalonyl-CoA

Jeder Meßpunkt: M/10 KPO₄ pH 6.5; M/100 Cystein; 3-C¹⁴-Methylmalonyl-CoA (20.4 · 10⁶ IpM/μMol); 10⁻⁴ M Mal-CoA; 4.6 mg/ml Enzym (700 mE/mg); T = 0°C; V = 1 ml; Reihenfolge der Zugabe: Acetyl-CoA + Malonyl-CoA (2 min), dann Methylmalonyl-CoA I: ohne Acetyl-CoA II: mit 3 · 10⁻⁴ Acetyl-CoA Aufarbeitung s. exp. Teil S. 123

Die Vergleichskurve I für freies Enzym muß gleiche Mengen Malonyl-CoA wie in II enthalten, um die in Abbildung 29 gezeigte Konkurrenz auszuschließen. Das Ergebnis des Versuches, die nur geringfügige Abnahme der Beladungshöhe von II gegenüber I, bestätigt die bereits geschilderten Ergebnisse und rechtfertigt die Aussage des Schemas in Abbildung 25: der Methylmalonyl-Rest besetzt im Gleichgewichtszustand zu mehr als 90 % die X-Gruppe und nur zu einem kleinen Teil die "zentrale" SH-Gruppe. Im Gegensatz dazu wird der Malonyl-Rest zwischen den beiden Gruppen im Verhältnis 1:1 verteilt, wie Abbildung 24 zu entnehmen war.

Diese Tatsache vermag einerseits das nicht rein kompetitive Verhalten des Methylmalonyl-CoA in der Fettsäuresynthese zu erklären (vgl. Abb. 27), andererseits versteht man leicht, warum die von HAGEN (16) gemessene Übertragung des Malonyl- und Methylmalonyl-Restes von Coenzym A auf Pantethein durch Synthetase mit gleicher Geschwindigkeit bewirkt wird. Für diese Transfer-Reaktion ist nach Abbildung 25 nämlich nur die intermediäre Besetzung der X-Gruppe notwendig, nicht aber die der "zentralen" SH-Gruppe.

b) Die Beladung nach Einwirken von SH-Reagenzien

Für die Reaktion des Enzyms mit SH-Reagenzien wurden Bedingungen gewählt, unter denen das Enzym vollständig gehemmt wird, in unserem Fall 10^{-2} M (JAA oder NÄM) für 10 Minuten bei 0°C . Mit M/10 Cystein fängt man den Überschuß des Inhibitors ab und setzt nach weiteren 10 Minuten die Enzymlösung in die Beladungsversuche ein. Um eventuell gebildeten Thioester zu erfassen, wurde das gewaschene Acyl-Protein in Ameisensäure gelöst und die eine Hälfte der Peroxidation mit PAS unterworfen. Abbildung 31 zeigt für den Acetat-Rest (für Malonat-Rest vgl. Abb. 24), daß nach Einwirkung von N-Äthyl-maleinimid kein Thioester mehr gebildet wird.

Dies bedeutet, daß NÄM unter den Reaktionsbedingungen sowohl die "zentrale", wie auch die "periphere" Gruppe besetzt hat. Die spezifische Beladung der X-Gruppen durch gleiche Acyl-CoA-Konzentration steigt in beiden Fällen nach der NÄM-Beladung des Enzyms leicht an; einen Grund für die Beladungserhöhung kennen wir nicht.

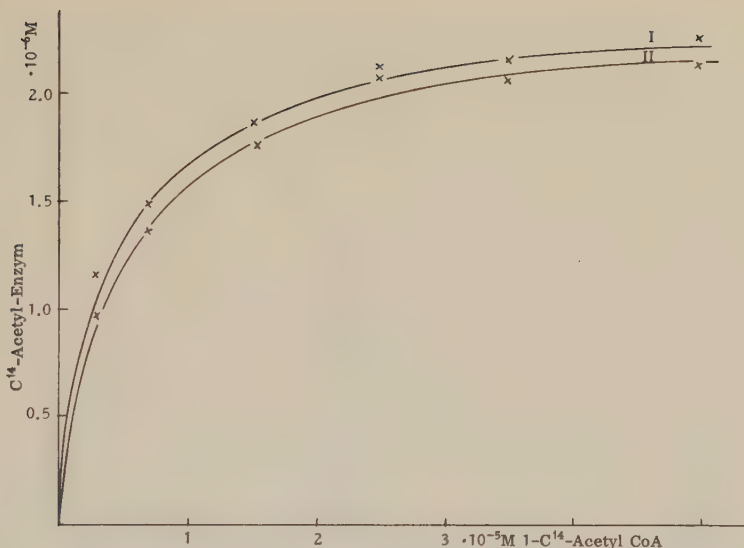
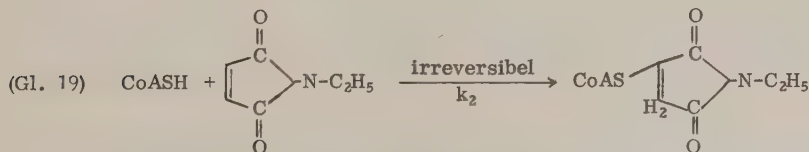
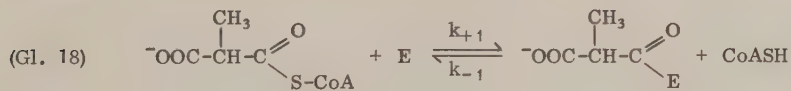


Abbildung 31 Acetylierung der Synthetase nach NÄM-Einwirkung

Jeder Meßpunkt: M/10 KPO₄ pH 6.5; 1-C¹⁴-Acetyl-CoA (25 · 10⁶ IpM/μMol); M/10 Cystein (pH 6.5); 3.68 mg/ml Enzym (650 mE/mg bzw. 0); T = 0°C; V = 1 ml; I Kontrollkurve ohne PAS-Behandlung II wie I, nach PAS-Behandlung.
Aufarbeitung s. exp. Teil S. 121 und 129

Die starke Beladungserhöhung durch den Methylmalonat-Rest bei gleichzeitiger Einwirkung von MeMal-CoA und NÄM, die SCHWEIZER (26) als erster gemessen hatte, konnte auf eine Gleichgewichtsverschiebung, verursacht durch NÄM, zurückgeführt werden:



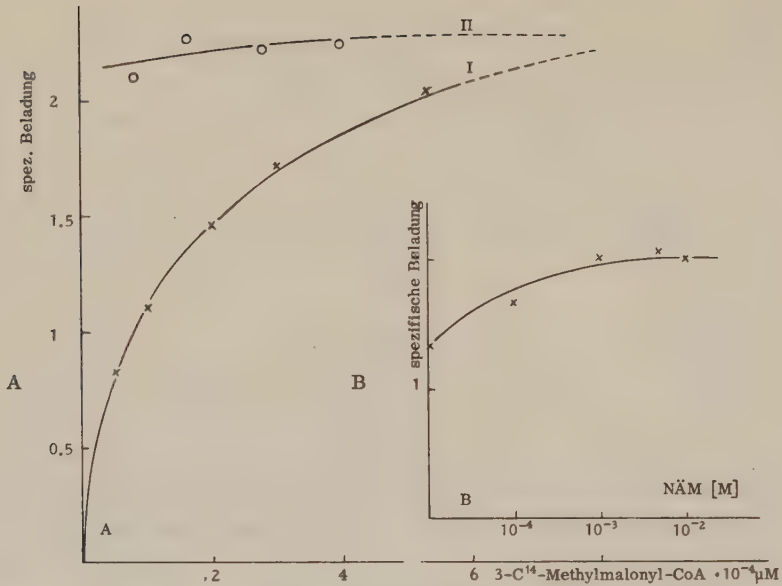


Abbildung 32 Die Gleichgewichtsverschiebung der Methylmalonyl-Beladung durch NÄM

A: Beladung mit und ohne gleichzeitiger NÄM-Einwirkung

I: ohne NÄM

II: mit 10^{-3} M NÄM

B: Beladung bei konstanter Methylmalonyl-CoA-Konzentration ($7.9 \cdot 10^{-5}$ M) und steigender NÄM-Konzentration

Jeder Meßpunkt: M/10 KPO_4 pH 6.5; 2.3 mg/ml Enzym, SH-frei (400 mE/mg); $3\text{-C}^{14}\text{-Methylmalonyl-CoA}$ ($13.3 \cdot 10^6$ IpM/ μMol); $T = 0^\circ\text{C}$; $V = 1$ ml; Ausführung s. exp. Teil S. 123

Abbildung 32 zeigt klar, daß eine spezifische Beladung von 2.5 unter den Versuchsbedingungen sowohl durch sehr hohe MeMal-CoA-Konzentration (bedingt durch die kleine Gleichgewichtskonstante, A), wie auch durch entsprechende NÄM-Konzentration (B) erreicht werden kann. Bei sehr kleinen NÄM-Konzentrationen kann man die Geschwindigkeit der Abfangreaktion (k_2 ; Abb. 33 II) direkt neben der Beladungsreaktion (k_{+1} ; Abb. 33 I) verfolgen.

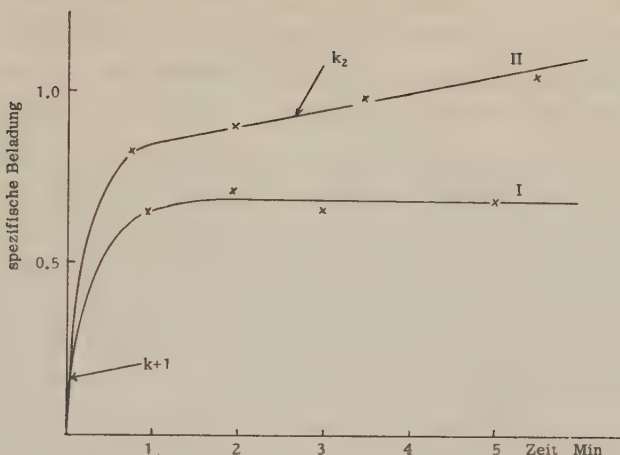


Abbildung 33 Kinetik der Gleichgewichtsverschiebung

Jeder Meßpunkt: M/10 KPO₄ pH 6.5; 2.3 mg/ml Enzym (1000 mE/mg); T = 0°C;
V = 1 ml; Ausführung s. exp. Teil S. 123
I ohne NÄM; II mit 10⁻⁴ M NÄM

Die Enzymaktivität blieb während der Zeitdauer des Versuchs in Abbildung 33 II infolge der geringen NÄM-Konzentration vollständig erhalten.

Mißt man das Gleichgewicht der Beladung nach NÄM-Hemmung mit der üblichen Methode (S. 126), so findet man den Wert von:

$$K_{eq} = 0.034 \quad *)$$

Für die Bildung des Acetoacetyl-Enzyms findet man eine Kongruenz von zunehmender Hemmung des Enzyms mit NÄM und abnehmender Beladung durch Acetoacetat. Die Hemmung seiner Bildung durch Jodacetamid-Einwirkung hatten bereits frühere Versuche von LYNEN (15) gezeigt. Diese Tatsachen stehen mit der Erwartung in Übereinstimmung, daß sowohl Reaktion der "zentralen" wie auch Reaktion der "peripheren" SH-Gruppe (durch JAA vgl. S. 71) die Bildung des Acetoacetyl-Enzyms verhindern müssen.

*) Etwa 10% des Methylmalonyl-Enzyms entziehen sich der Gleichgewichtsverschiebung durch CoASH aus unbekanntem Grund. Sie wurden nach Art eines Blindwertes für die Berechnung von K_{eq} abgezogen.

Durch die Tatsache, daß nach Blockierung der SH-Gruppen die Nicht-Thioestergruppen des Enzyms unvermindert Acyl-Reste binden können, wird die in Abbildung 25 gezeigte Sequenz der Beladungsreaktionen unterstützt. Es ist hieraus auch verständlich, daß die Transferaseaktivität der Synthetase durch NÄM und JAA nicht beeinflusst wird (17). Die Peptidanalyse des Acetyl-Enzyms zeigt, daß der Acetyl-Rest die "zentrale" und die "periphere" SH-Gruppe besetzt (S. 48-67). Nach Reaktion der letzteren mit JAA (vgl. S. 71) wird nur noch die "zentrale" SH-Gruppe mit Acetat beladen.

Als einen Beweis für den in Abbildung 25 geschilderten Weg des Acetats vom Coenzym A über die Y-Gruppe zur "zentralen" SH-Gruppe muß man die deacylierende Aktivität der Synthetase in Bezug auf Acetyl-CoA ansehen, die von NÄM und JAA unbeeinflusst verläuft und für Methylmalonyl-CoA (X-Gruppe) nur 1/30 des Wertes für Acetyl-CoA beträgt (vgl. S. 99). Schließlich geben Versuche von LYNNEN (14) ein Indiz, daß der Acetat-Rest von der Y-Gruppe nicht direkt zur "peripheren" SH-Gruppe gelangen kann, sondern die "zentrale" SH-Gruppe passiert:

Während Malonat nicht, wohl aber Acetat vor NÄM schützt, wie dies aufgrund der Verteilung (Abb. 25) gut zu verstehen ist, hindert das Inkubationsgemisch von Enzym Acetyl- und Malonyl-CoA den Angriff von NÄM nur wenig. Es kann also kein Acetat-Rest auf die durch die Kondensation freigewordene "periphere" SH-Gruppe übertragen werden, solange der Acetoacetat-Rest die "zentrale" SH-Gruppe besetzt. Für eine ungestörte Kettenverlängerung bis zum Palmityl-Rest erscheint dieses Schema sinnvoll, weil nach ihm erst dann die Synthese einer neuen Kette mit Acetyl-CoA als Starter beginnen kann, wenn der Palmityl- oder Stearyl-Rest vom Enzym abgelöst worden ist.

4. Die Peptidanalyse für das Acetyl-Enzym

Ein weiterer Beweis für unsere Behauptung, der Acetat-Rest besetze auch die "zentrale" SH-Gruppe, war über eine Charakterisierung der nach proteolytischem Abbau entstandenen Peptide zu führen.

Für Acetyl-Synthetase, die, wie auf Seite 32 gezeigt wurde, ein Gemisch von Acetylthioester und anderen Essigsäureestern darstellt, war von vornherein die tryptische Verdauung sowie die Anwendung von Reinigungsverfahren, die im pH-Bereich oberhalb 7 arbeiten, wegen der Alkali-Labilität dieser Substanzen ausgeschlossen. Dies komplizierte die Isolierung der einzelnen Peptide der aktiven Zentren erheblich; bei

Ketten, die insgesamt etwa 10 000 Aminosäuren enthalten, erhält man, wenn man mit einer Durchschnittslänge von 5 Aminosäuren pro Peptid rechnet, rund 2000 verschiedene Peptide nach Verdauung des Enzyms, d.h. für die Reinigung eines Peptids ist eine rund 2000fache Anreicherung nötig.

Zur Auftrennung des Peptidgemisches wendeten wir die Reihenfolge 1. Anionenaustauscher, 2. Kationenaustauscher, 3. Hochspannungselektrophorese, 4. Papierchromatographie als Reinigungsoperationen an. Für den proteolytischen Abbau wurden die Angaben von SCHWEIZER (in 25) befolgt. Hierzu wird die mit Trichloressigsäure denaturierte, durch Waschen von niedermolekularer Radioaktivität befreite Acetyl-Synthetase in M/100 HCl suspendiert und mit einem Zehntel ihres Gewichtes an kristallinem Pepsin versetzt. Nach etwa 40 Stunden bei Zimmertemperatur wird die Lösung eingeengt, vom ausfallenden Pepsin abgetrennt und in konzentrierter Lösung auf eine vorbereitete DEAE-Sephadex-Säule gegeben. Leider konnten, wie SCHWEIZER in ersten Versuchen fand, keine Ionenaustauscher auf Harzbasis für die säulenchromatographische Trennung verwendet werden, da ein Teil des radioaktiven Materials nicht mehr von der Säule eluiert werden kann. Die Gründe hierfür wurden später in der Tatsache gefunden, daß das Peptid der "peripheren" SH-Gruppe vermutlich einen Tryptophan-Rest enthält, der starke Adsorption an die aus Benzolringen aufgebaute Harzmatrix verursacht. Die Trennleistung von Sephadex-Säulen ist zwar der von Harzaustauscher-Säulen unterlegen, zeigt jedoch nicht so stark den Nachteil unspezifischer Adsorption.

Die Chromatographie wurde unter Verwendung flüchtiger Puffer ausgeführt, wie sie von BRAUNITZER beschrieben worden ist (31, 32). Durch Messen der Radioaktivität mit Aliquoten jeder zweiten Fraktion ermittelt man die Verteilung der radioaktiven Gipfel. Die Abtrennung von nicht radioaktivem, ninhydrinpositivem Material verfolgten wir durch quantitative Bestimmung nach STEIN und MOORE (33) oder, aus Gründen der Zeit- und Materialersparnis, mit einem Tüpfeltest auf Papier.

Für die Kationenaustauscher-Chromatographie wie auch die weiteren Reinigungsschritte werden die eluierten Gipfel durch wiederholtes Eindampfen mit Wasser salzfrei gemacht.

Für die präparative Papierelektrophorese verwendeten wir eine nach MICHLIS (34) Angaben konstruierte Apparatur, die als Kühlmittel eine hochsiedende Petrolätherfraktion verwendet und, wegen ihres größeren Trennweges, der Plattenelektrophorese

nach Wieland-Pfleiderer vorgezogen wurde. Da das verwendete Whatman-III-Papier eine maximale Kapazität von etwa 2 mg pro cm besitzt, wenn das Peptidgemisch strichförmig aufgetragen wird, wurde bei größeren Ansätzen als Vortrennung die trägerfreie Hochspannungselektrophorese nach HANNIG gewählt (35), die zwar geringere Trennleistung, aber unbegrenzte Kapazität besitzt. Radioaktive Peptide auf Papier wurden durch Radioautographie identifiziert, die Banden ausgeschnitten und für die nachfolgende Papierchromatographie in neue Papierbögen eingenäht. Die Elutionsverluste, die bis zu 50 % erreichen, können auf diese Weise vermieden werden. Um die für Elektrophorese und Papierchromatographie günstigen pH-Werte bzw. Lösungsmittelsysteme zu ermitteln, wurden in Vorversuchen jeweils etwa 10 000 IpM den betreffenden Bedingungen unterworfen, die Streifen nach Trocknen mit einer Lösung von Ninhydrin in Aceton besprüht und die Abtrennung Ninhydrin-positiven Materials von der im Streifenzähler ermittelten Radioaktivitätszone bewertet. Das radioaktive Peptid selbst lag in diesen Fällen in seiner Konzentration unter der Nachweisgrenze der Farbreaktion. Für die Elektrophorese erwies sich der pH-Wert von 3,5 von den in der Literatur (36) üblichen pH-Werten 1,9, 3,5 und 6,2 als der günstigste.

In Tabelle 8 ist eine Aufstellung sämtlicher Ansätze der Pepsin-Spaltung von C¹⁴-Acetyl-Synthetase wiedergegeben, die wir ausführten.

Ihr können die Werte für Proteinkonzentration, Substratkonzentration, Pepsinmenge, Verdauungszeit, die Dimension der zur Trennung benutzten Säulen, die Ausbeuten der Säulenchromatographie und die relative Verteilung über die Peptidgruppen entnommen werden. Für die Bezeichnung der Peptide wählten wir für die Gipfel der DEAE-Sephadex-Chromatographie die Bezeichnung DEG mit fortlaufender Nummernbezeichnung und für die CM-Sephadex-Chromatographie die Bezeichnung CMG. Um eine rasche Erkennung der Thioesterpeptide zu erhalten, an denen wir besonders interessiert waren, wurden jeweils Proben von 5000-10000 IpM in Lösung mit PAS oder auf den ausgeschnittenen Papierstreifen von Pherogrammen in PAS-Atmosphäre behandelt und die stabile Radioaktivität gemessen.

Die folgenden Abbildungen (34-40) zeigen nun den Trennungsgang der Acetylpeptide.

Tabelle 8 Pepsin-Spaltansätze von C¹⁴-Acetyl-Synthetase

Ziffer des Ansatzes	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Eingesetzte Synthetase g	0,045	0,125	0,300	0,600	0,470	0,180	1,85	7,50
Spezifische Aktivität mE/mg	520	800	900	2420	950	800	2000	2000
Proteinkonzentration mg/ml	7	10	13	50	53	24	74	30
1-C ¹⁴ -Acetyl-CoA-Konzentration 10 ⁻⁴ M	0,5	1	1	1	1	4	3	2,4
Inkubationszeit Min.	5	5	5	5	5	5	6	4
spez. Beladung Mol Acetat Mol Synthetase	2,7	2,8	3,8	2,9	2,0	5,0	3,5	3,0
Pepsin mg	5	23	30	60	50	30	190	675(+275)
Verdauungszeiten Stunden	18	44	23	36	36	48	41	12(+24)
DEAE-A ₂₅ -Säule Ausmaß in cm	-	1 · 130	1 · 200	2,3 · 200	2 · 200	1,5 · 200	3,5 · 200	2 Säulen 4,5 · 200
Ausbeuten an DEAE-Säule	-	-	98%	95%	100%	93%	-	90%
./ DEG ₁ im Eluat	-	25	25	35	36	36	42	35
./ DEG ₂ im Eluat	-	25	30	16	-	25	11	21
./ DEG ₃ im Eluat	-	10	5	6	-	7	11	10
./ DEG ₄ -DEG ₆ im Eluat	-	40	40	42	-	32	34	35
DEG ₁ CM _{6,25} -Säule Ausmaß in cm	-	-	-	1 · 120	-	-	1 · 120	2 · 200
Ausbeuten an CM-Säule	-	-	93%	88%	88%	-	75%	83%
./ DEG ₁ CMG ₁ im Eluat	-	-	46	57	-	50	50	43
./ DEG ₁ CMG ₃₋₅	-	-	54	43	-	50	50	57

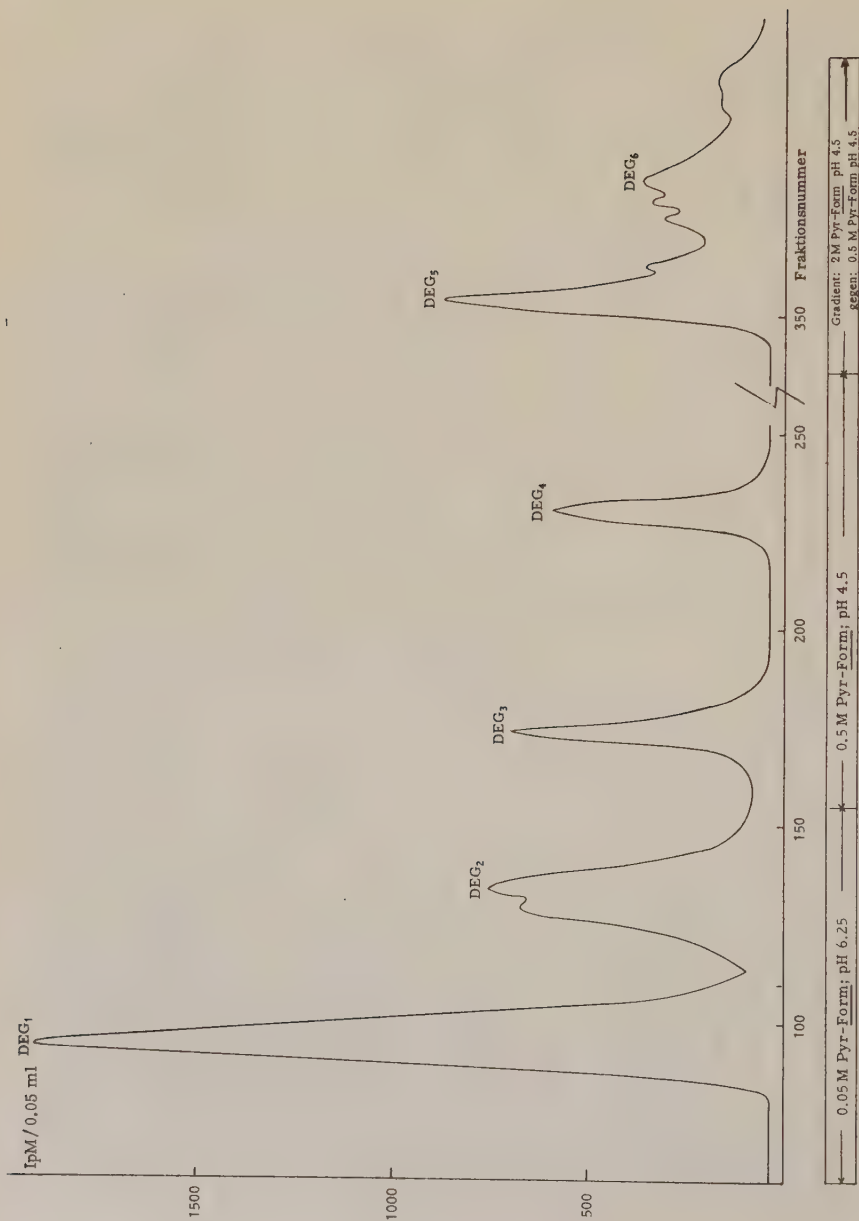


Abbildung 34 DEAE-Sephadex-Chromatographie des peptischen Hydrolysates von C¹⁴-Acetyl-Synthetase

Ansatz VIII, siehe Tabelle 8; Fraktionsvolumen: 15 ml; Mischvolumen: 2000 ml.

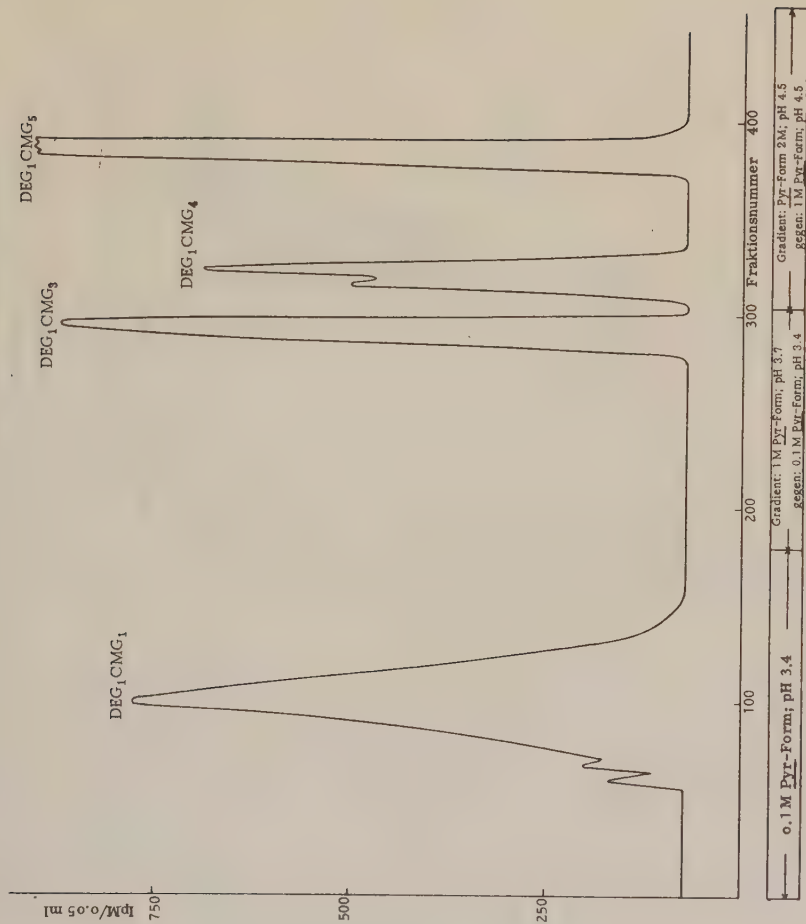


Abbildung 35 CM-Sephadex-Chromatographie des DEG₁-Gipfels aus Abbildung 34
 Fraktionsvolumen: 10 ml; Mischvolumen: 1000 ml; Ausführung wie Abb. 34

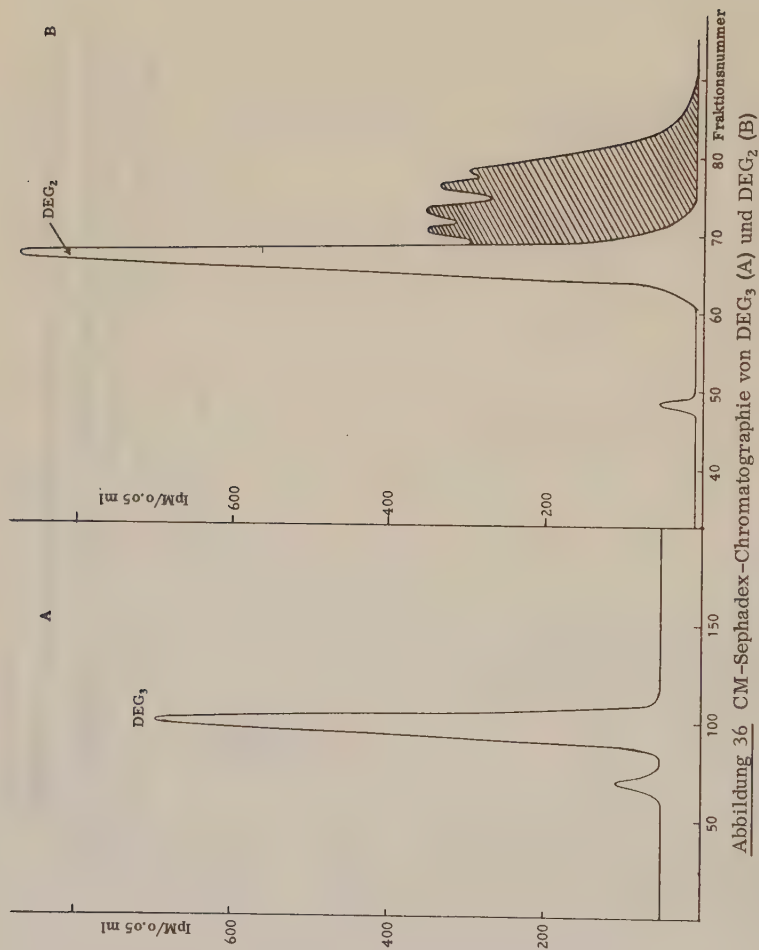


Abbildung 36 CM-Sephadex-Chromatographie von DEG₃ (A) und DEG₂ (B)

- A: Ansatz VIII; Säule 2 x 200 cm; Elution mit 0,1 M PyrForm pH 3,4; Fraktions-Vol.: 8 ml; Ausbeute: 70 %
- B: Ansatz VIII; Säule 2,5 x 200 cm; Elution mit 0,1 M PyrForm pH 3,4; Fraktions-Vol.: 15 ml; die Gipfel der schraffierten Fläche traten in anderen Ansätzen nicht auf; es handelt sich um Nicht-Thioester, die bei längerem Stehen offenbar als Artefakte entstehen.

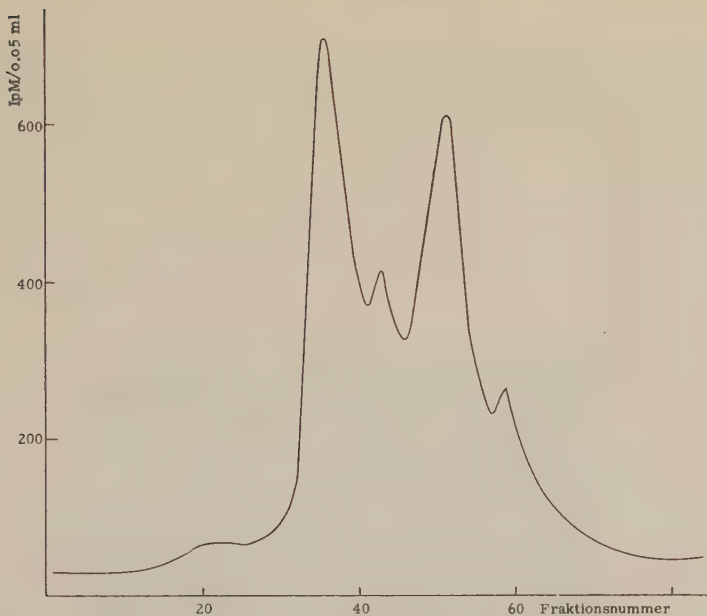


Abbildung 37 CM-Sephadex-Chromatographie von DEG_4

Ansatz VII; Säule 2 x 200 cm; Elution mit 0,1 M PyrForm pH 3,4; Fraktions-Vol.: 2 ml; Ausbeute: 80%

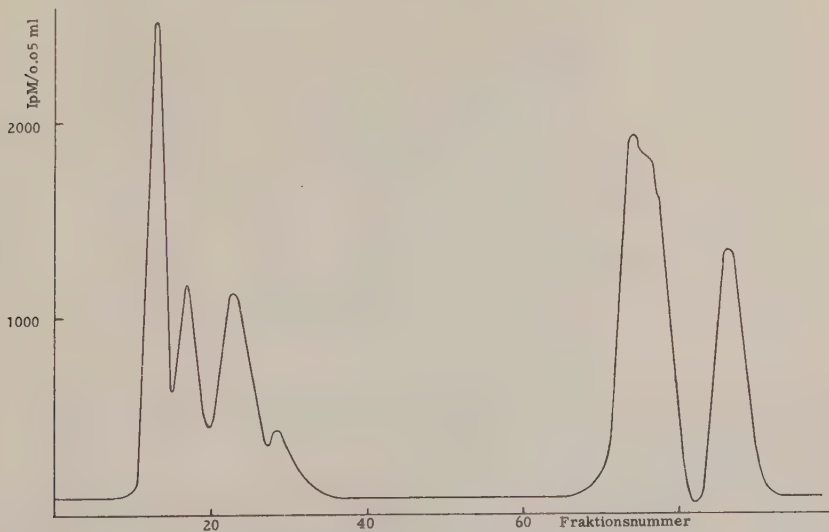


Abbildung 38 Dowex-50-Chromatographie von DEG_5

Ansatz VIII; Säule 1 x 120 cm; Austauscher in Pyr^+ -Form, 200-400 mesh; Elution mit 0,1 M PyrForm pH 3,0; Fraktions-Vol.: 5 ml; Ausbeute: 90%; Ausführung s. expt. Teil S. 131

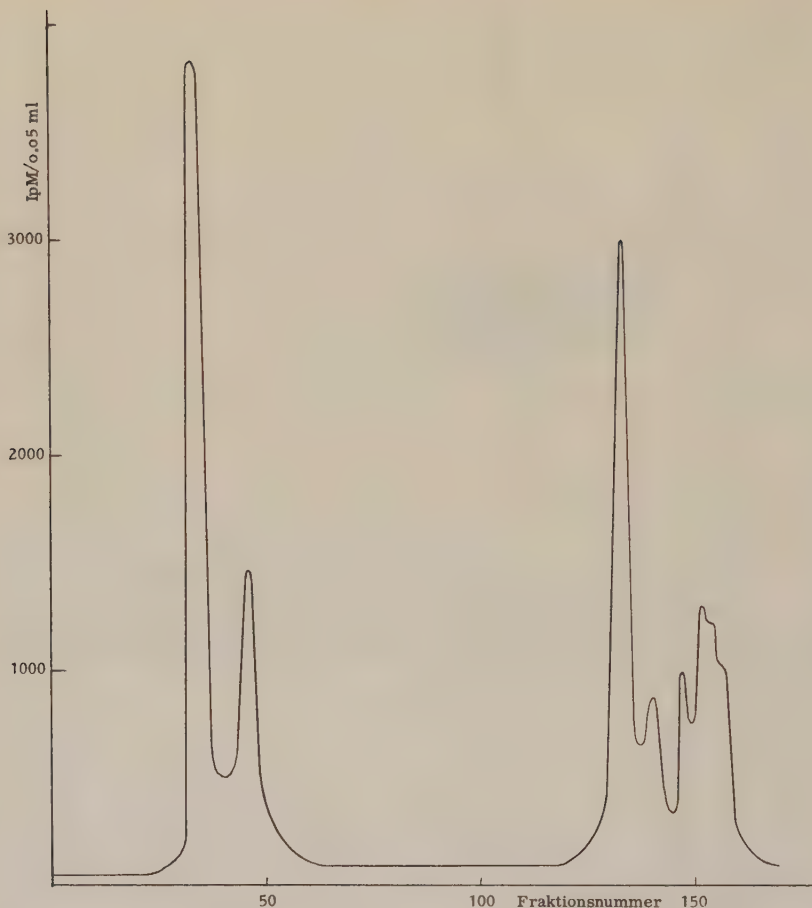


Abbildung 39 Dowex-50-Chromatographie von DEG_6
Ansatz VIII; sonst wie unter Abb. 38

Die Tatsache, daß wir 15-20 Peptide fanden, führt uns zu dem Verdacht, daß, zumindest teilweise, Transacylierungen im Peptidgemisch stattfinden.

Die ersten drei Gipfel der DEAE-Sephadex-Chromatographie vereinigen 60-65 % des radioaktiven Materials und spalten in insgesamt drei radioaktive und drei nicht-radioaktive Peptide bei der weiteren Reinigung auf. Die drei Thioester-Peptide DEG_1CMG_1 , DEG_2 und DEG_3 gehören der Klasse der neutralen Peptide an, d.h. werden sowohl auf

Anionenaustauschern wie auch auf Kationenaustauschern mit dem Puffergemisch eluiert, indem sie auf die Säule gebracht wurden. Die drei mit dem DEG_1 -Gipfel eluierten Nicht-Thioester-Peptide zeigen abgestuft basischen Charakter und stellen mit rund 15 % den Hauptteil der nicht PAS-oxidierbaren Peptide. Um einen Eindruck von der Vielfalt der Peptide zu geben, die mit den Gipfeln DEG_4 - DEG_6 als stark saure Komponenten eluiert werden, ist eine radioautographische Sichtbarmachung nach elektrophoretischer Trennung wiedergegeben (Abb. 40).

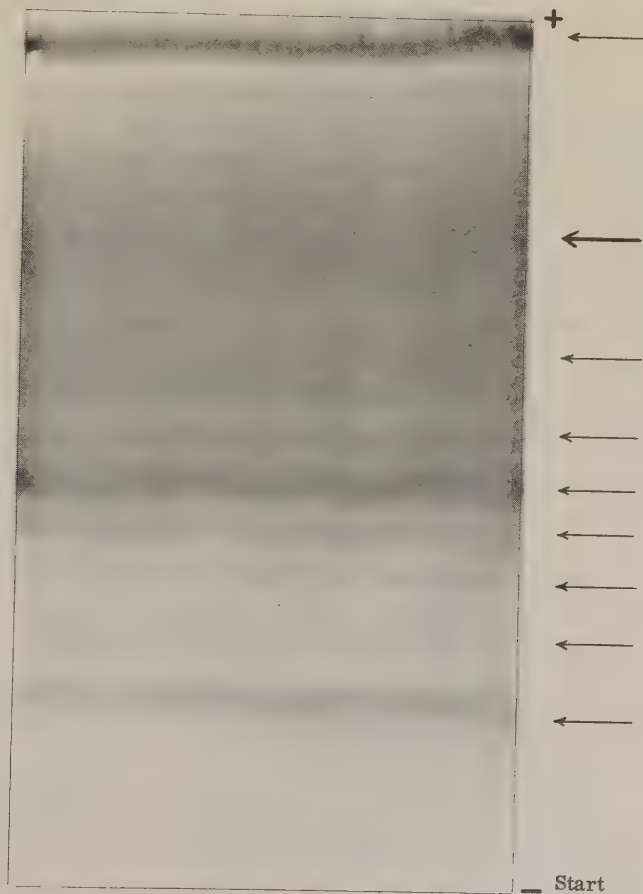


Abbildung 40 Radioautographie der elektrophoretisch getrennten Gipfel DEG_4 DEG_6

Die charakteristischen Eigenschaften der einzelnen Peptide faßt Tabelle 9 zusammen.

Tabelle 9 Charakteristische Eigenschaften der Acetylpeptide

Peptid	Elutionsverhalten auf Ionenaustauschersäulen ¹	Verhalten in der Elektrophorese ²	Verhalten in der Papierchromatographie ³
DEG ₁ CMG ₁ = "Peripheres" Peptid	neutral	pH 1,9: $12,9 \cdot 10^{-5}$ (Kation) pH 3,5: $4,3 \cdot 10^{-5}$ (Kation) pH 6,2: $2,8 \cdot 10^{-5}$ (Kation)	System B 0,48
DEG ₁ CMG ₃ = Nicht-Thioester Peptid	basisch	pH 1,9: $8,3 \cdot 10^{-5}$ (Kation) pH 3,5: $8,3 \cdot 10^{-5}$ (Kation) pH 6,2: $7,0 \cdot 10^{-5}$ (Kation)	System A 0
DEG ₁ CMG ₄ = Nicht-Thioester Peptid	basisch	pH 3,5: $8,8 \cdot 10^{-5}$ (Kation) pH 6,2: $5,7 \cdot 10^{-5}$ (Kation)	System A " C " D 0,03 0,80 0,68
DEG ₁ CMG ₅ = Nicht-Thioester Peptid	basisch	pH 6,2: $7,0 \cdot 10^{-5}$ (Kation)	System A 0
DEG ₂ = "zentrales" Peptid	neutral	pH 3,5: $3,0 \cdot 10^{-5}$ (Kation) pH 6,2: $1,0 \cdot 10^{-5}$ (Kation)	System A 0,21
DEG ₃ = "peripheres" Peptid	neutral	pH 1,9: $5,5 \cdot 10^{-5}$ (Kation) pH 3,5: $2,4 \cdot 10^{-5}$ (Kation) pH 6,2: $1,3 \cdot 10^{-5}$ (Kation)	System A System B 0,45 0,45

¹ Als neutral werden solche Peptide bezeichnet, die weder auf Anionenaustauschersäulen noch auf Kationenaustauschersäulen mit nennenswerter Retention eluiert werden.

Basische Peptide wandern auf Anionenaustauschern ohne Retention, auf Kationenaustauschern mit Retention.

² Angabe der elektrophoretischen Mobilität in $\text{cm}^2/\text{Volt} \cdot \text{sec}$

³ Angabe der R_f -Werte; die Zusammensetzung der Lösungsmittelsysteme ist auf S. 133 beschrieben.

Als Charakterisierungsgröße für die Elektrophorese wurde die elektrophoretische Mobilität, ausgedrückt in Wanderungsstrecke (cm) pro Sekunde und Feldstärkeneinheit (V/cm), verwendet, für die Papierchromatographie, wie üblich, der R_f -Wert.

Unser Interesse richtete sich bei der weiteren Reinigung insbesondere auf die Thioesterpeptide, da sie durch ihre Zusammensetzung den direkten Beweis der Beladung der "zentralen" SH-Gruppe auch durch den Acetat-Rest liefern konnte. Hierzu ist es notwendig, auf die Ergebnisse von den Arbeitsgruppen um VAGELOS einerseits und WAKIL andererseits hinzuweisen (78, 79). Der Fettsäuren synthetisierende Komplex aus *Escherichia coli* kann nur in Form seiner Teilkomponenten isoliert werden. VAGELOS zeigte, daß ein Protein vom Molekulargewicht 10 000 das sogenannte "acyl-Carrier-Protein" (ACP) als Träger des Malonyl-Restes und der Acylzwischenverbindungen auf dem Weg von Acetyl-CoA zu den höheren Acyl-CoA-Resten fungiert. Es konnte gezeigt werden, daß ein 4'-Phosphopantethein-Rest als Phosphodiester mit einem Serin-Rest des Proteins verbunden ist, und als Acceptor des Acyl-Restes im ACP-Molekül, das keinen Cystein-Rest enthält, die SH-Gruppe des Cysteamins am Ende des 4'-Phosphopantetheins besitzt. SCHWEIZER (in 25) zeigte, daß auch im Enzymkomplex aus Hefe ein 4'-Phosphopantethein-Rest enthalten ist, der durch milde Alkali-Einwirkung wie im Falle des "ACP" freigesetzt wird, was auf eine Bindung ebenfalls an einen Serin- oder Threonin-Rest einer Peptidkette sprach. WELLS bestätigte diese Versuche durch Einbau von C^{14} -Pantothensäure in die Fettsäuresynthetase einer Hefe-Pantothensäure-Mangelmutante (37).

Mit den Ergebnissen dieser Versuche war eine Unterscheidungsmöglichkeit von Peptiden der "zentralen" SH-Gruppe und denen der "peripheren" gegeben. Unterwirft man nämlich aliquote Mengen eines Thioesters der Totalhydrolyse nach den Angaben von STEIN und MOORE (38) und analysiert das entstehende Aminosäuregemisch im Aminosäureanalysator (28), so stimmen nur im Fall eines Thioesters der "zentralen" SH-Gruppe der Gehalt an den seltenen Aminosäuren β -Alanin bzw. Cysteamin und die eingesetzte, durch den C^{14} -Acylrest bedingte Radioaktivität überein.

SCHWEIZER zeigte, daß, wie erwartet, der einzige Thioestergipfel des Malonyl-Peptidgemisches ein Thioester der "zentralen" SH-Gruppe war (26). Bei den Untersuchungen der Acetyl-Peptide stellte sich heraus, daß von den drei Hauptgipfeln die Gipfel DEG_1 , DEG_3 und weiterhin DEG_4 und DEG_6 Peptide der "peripheren" Gruppe waren, während der Gipfel DEG_2 sich als Acetylthioester eines "zentralen" Peptides herausstellte.

Seine Reinigung wurde zunächst in Angriff genommen. Nach 4 Reinigungsoperationen erhielten wir ein einheitliches Peptidmaterial, einheitlich nach den Kriterien, daß nur mehr eine Aminoendgruppe gefunden wurde und die Totalhydrolyse eine mit der eingesetzten Radioaktivitätsmenge übereinstimmende stöchiometrische Zusammensetzung aus 7 Aminosäuren ergab.

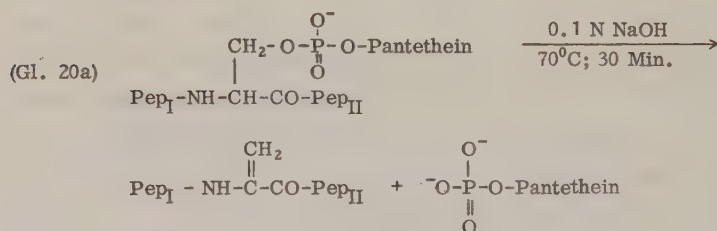
Die Aminosäureanalyse lieferte folgende Werte (bezogen auf eingesetztes C¹⁴-Acetyl-Peptid):

Aminosäure:	Lysin	Prolin	Glycin	Alanin	Valin
Reste:	1.08	1.10	1.16	1.02	0.92

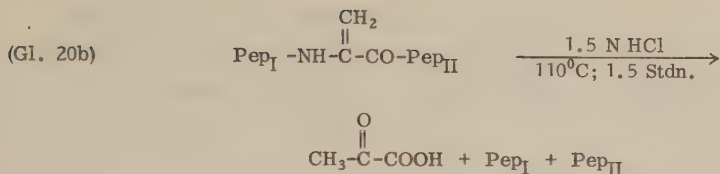
Aminosäure:	β-Alanin	Cysteamin (als Taurin bestimmt)
Reste:	1.05	0.81
	(1.35 oxidiert)*)	

Unerklärt bleibt die Tatsache, daß Serin nur in Spuren gefunden wurde (vgl. dagegen 18). Da in der Aminosäureanalyse auch kein Phosphoserin gefunden wurde, mußte entweder der Serin-Rest bei der Hydrolyse zerstört worden sein oder unter den Bedingungen der Hydrolyse als Phosphodiester der Pantoinsäure freigesetzt worden sein.

Wir bewiesen nun auf einem anderen Weg die Bindung des 4'-Pantetheins an einen Serin-Rest der Peptidkette. VAGELOS (78) hatte gezeigt, daß der 4'-Phosphopantethenyl-Rest eine "leicht austretende" Gruppe darstellt, wie sie von PATCHORNIK zur selektiven Spaltung von Peptidketten an Cystein- und Serin-Resten benutzt wird (39):



*) Höhere Werte des β-Alanins nach Peroxidation des Peptides, die durchgeführt werden muß, um eine fehlerfreie Cysteamin-Bestimmung zu gewährleisten, treten aus unbekannten Gründen auf (E. SCHWEIZER, unveröffentlichte Beobachtung).



Milde alkalische Hydrolyse liefert einen Dehydroalanin-Rest in der Kette, der bei milder salzsaurer Behandlung durch Spaltung der Kette ein Äquivalent Pyruvat bildet.

Das nach dieser Behandlung des "zentralen" Peptids entstandene Pyruvat setzten wir mit Lactatdehydrogenase und NADH, nach Gleichung 21, zu Lactat um.



Bezogen auf eingesetztes Peptid wurden 100 % Pyruvat, gemessen durch die NADH-Abnahme im optischen Test, gefunden. Um eine Bindung an einen Threonin-Rest statt Serin-Rest auszuschließen, führten wir in einem zweiten Versuch das entstandene Pyruvat in sein 2.4-Dinitrophenylhydrazon über und stellten die Identität des entstandenen Hydrazons mit dem von authentischem Pyruvat durch Papierchromatographie fest. Das 2.4-Dinitrophenylhydrazon von α -Ketobutyrat, welches das Produkt im Falle einer Bindung an Threonin wäre, verhält sich, wie Abbildung 41 zeigt, bei der Chromatographie in wassergesättigtem Butanol anders. Substanz A und B stimmen in Anzahl, Verteilung und Intensität der Flecken überein, d.h. die Aminosäure in der Polypeptidkette, die den 4'-Phosphopantetheinrest trägt, ist Serin.

Die Flecken III (Abb. 41) der Pyruvatphenylhydrazone sind nicht identisch mit dem des Acetaldehyds (V, Abb. 41) sondern vermutlich das Hydrazon eines in der Literatur beschriebenen Polymeren des Pyruvates (85, 86). Wurde frisch destillierte Brenztraubensäure als Vergleichssubstanz eingesetzt, so fehlte bei der Chromatographie in B (Abb. 41) der Fleck III.

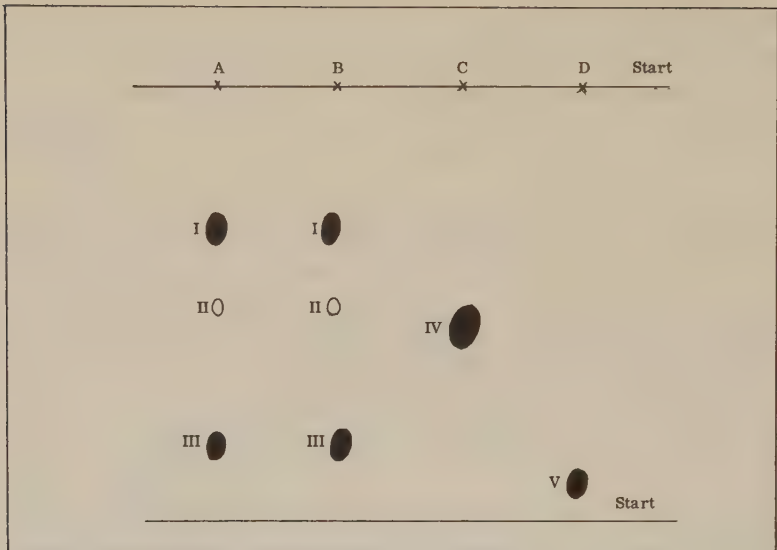


Abbildung 41 Papierchromatographie der 2.4-Dinitrophenylhydrazone von Pyruvat (A,B), α -Ketobutyrat (C) und Acetaldehyd (D)

A: Probe aus "zentralem" Peptid (nach Gl. 20 umgesetzt)
B: Authentisches Pyruvat

Aufgetragen je 2.5 μ ; Ausführung siehe exp. Teil S. 133

- I, II cis-trans Isomere des Pyruvathydrazone im Verhältnis
> 10:1 = I:II mit den R_f -Werten 0.34 bzw. 0.52
- III vermutlich Hydrazone eines Polymeren von Pyruvat
mit R_f -Wert 0.83
- IV Hydrazone von α -Ketobutyrat mit R_f -Wert 0.56
- V Hydrazone von Acetaldehyd mit R_f -Wert 0.91

Daß der Lysin-Rest am Aminoende des Peptides steht, wurde durch Dünnschichtchromatographie des mit Dimethylamino-Naphthalin-Sulfonsäurechlorid (Dansyl-Cl) umgesetzten Peptidhydrolysates bewiesen (40). Man findet ein Di-Dansyl-Lysin, welches nach Van Slyke-Oxidation des Peptides und anschließend identischer Behandlung wie oben verschwunden ist. Der basische Aminosäure-Rest, die negative Ladung der Phosphatbrücke neutralisierend, erklärt auch die elektrische Neutralität des Peptides (vgl. Tab. 9).

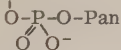
Aus der Umsetzung des "zentralen" Peptides nach Gleichung 20 erhält man eine Lösung der Peptidbruchstücke links und rechts vom Serin-Rest in der Kette, Pep_I und Pep_{II} . Wir unterwarfen das Gemisch dem Edmann-Abbau, um Einblick in die Sequenz des "zentralen" Peptides zu erhalten.

Nach HARTLEY (41) kann der Edmann-Abbau im μMol -Maßstab ausgeführt werden, wenn man zur Identifizierung der jeweiligen Endgruppe die Umsetzung mit Dansyl-Cl und anschließende salzsaure Spaltung wählt, wozu jeweils ein Zehntel der Gesamtmenge von etwa 15-20 μMol abgezweigt wird. Die Hauptmenge durchläuft cyclisch mehrere Abbaustufen. Wir erhielten als Ergebnis der Dansyl-Aminosäure-Dünnschichtchromatographie:

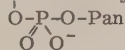
1. Stufe: Lysin, Valin
2. Stufe: Prolin, Glycin
3. Stufe: Alanin
4. Stufe: -
5. Stufe: -

Ihm ist zu entnehmen, daß die Peptidbruchstücke Pep_I und Pep_{II} (vgl. Gl. 21) im "zentralen" Peptid aus einem Tripeptid und einem Dipeptid bestehen. Die Aminosäuren Lysin und Valin sind in ihnen endständig (1. Stufe). Da im intakten Peptid Aminoendgruppe Lysin ist, muß Valin auf den Serinrest in der Kette folgen. Mit der Unsicherheit der Stellung von Prolin, Glycin und Alanin ergeben sich für das "zentrale" Peptid damit insgesamt 4 mögliche Sequenzen:

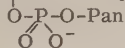
a) Lys-Gly-Ala-Ser-Val-Pro



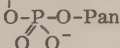
b) Lys-Pro-Ala-Ser-Val-Gly



c) Lys-Pro-Ser-Val-Gly-Ala



d) Lys-Gly-Ser-Val-Pro-Ala



Eine Entscheidung über die wirkliche Sequenz werden erst weitere Versuche bringen, doch ist die Spaltung einer Peptidkette durch Pepsin an Prolin- oder Glycin-Resten nach TANG (42) unwahrscheinlich, so daß wir den Sequenzen c und d den Vorzug geben. Selbst mit der Unsicherheit der Sequenz kann man einen Vergleich mit den Ergebnissen der Sequenzanalyse am Acyl Carrier Protein aus E.coli anstellen und feststellen, daß die Aminosäureumgebung der Bindungsstelle des 4'-Phosphopantethein-Restes im Hefe-Enzym und ACP grundlegend verschieden ist (Abb. 42):

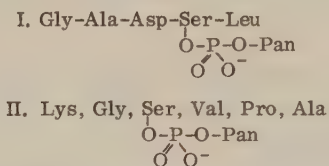


Abbildung 42 Vergleich der Aminosäureumgebung des 4'-Phosphopantetheins im Acyl Carrier Protein(I) und der Fettsäuresynthetase aus Hefe (II). Pan = Pantethein

Unterstützt wird diese Behauptung auch durch ein weiteres "zentrales" Peptid, welches in geringer Menge auftritt und papierchromatographisch vom oben beschriebenen Peptid abgetrennt werden kann ($R_f = 0.44$ in System A, S. 133). Es enthält außer denselben Aminosäuren noch Cystein und Asparagin-(säure) in stöchiometrischen Mengen *). ACP enthält dagegen kein Cystein. Die Unterschiede verwundern jedoch nicht angesichts der Tatsache, daß in beiden Fällen die Peptidkette nur Träger einer Funktion ist und nicht ein aktives Zentrum gleicher enzymatischer Katalyse darstellt; zudem muß das Trägerprotein in der Synthetase an den Enzymkomplex gebunden sein, und man kann vermuten, daß dies über Disulfidbrücken von Cystein-Resten geschieht.

*) Da es nicht vollständig von verunreinigenden Peptiden abgetrennt werden konnte, ist es nicht in seiner Zusammensetzung angegeben.

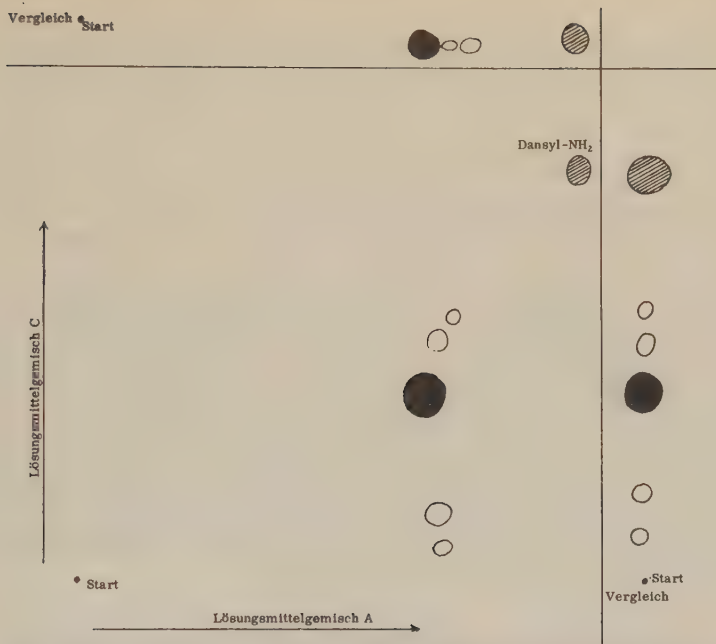
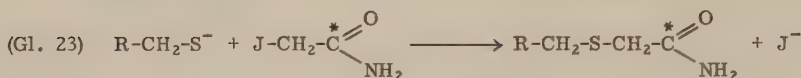
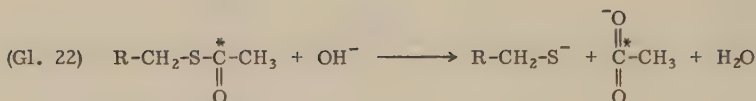


Abbildung 43 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der Dansyl-Aminosäure vom Aminoende des "peripheren" Peptides.

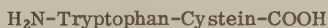
Als Vergleich diente Dansyl-Tryptophan, welches wie die Probe 6 Stunden in 5.8 N HCl bei 110°C gehalten worden war. Exp. Einzelheiten S. 135

Die Bemühungen, das "periphere" Peptid zu reinigen, führten nicht zum gewünschten Erfolg. Es war insbesondere ein Peptid der Zusammensetzung (Thre, Ser, Pro, Gly₂, Ala, Val, Ileu, His) mit Histidin am Aminoende, welches das "periphere" Peptid hartnäckig begleitete. Ein Versuch, das "periphere" Peptid nach Oxidation mit PAS aufgrund der neu entstandenen Negativladung der Sulfonsäure (die Verunreinigungen enthalten kein Cystein) durch eine wiederholte Elektrophorese abzutrennen, schlug fehl. Es stellte sich durch Endgruppenanalyse mit Dansyl-Cl heraus, daß sehr wahrscheinlich Tryptophan am Aminoende des Peptides steht (Abb. 43). Auch die Absorption des Peptides bei 280 mμ bestätigte diese Annahme. Bedingt durch den Tryptophangehalt wird das Peptid durch PAS in unspezifischer Weise verändert, so daß bei anschließender Elektrophorese Verschmierung der Substanz eintritt.

Wir hydrolysierten deshalb den Peptidthioester in Gegenwart von C¹⁴-Jodacetamid alkalisch, wobei, wie durch Kontrollversuche gemessen wurde, folgende Umsetzung eintritt:



Das radioaktive Reaktionsgemisch wurde der Elektrophorese unterworfen. Das entstandene C^{14} -Carboxamidomethylpeptid besitzt die gleiche elektrophoretische Mobilität wie das Acetyl-Peptid. Es wurde anschließend der Umsetzung mit Dansyl-Cl und einer präparativen Dünnschichtchromatographie im Lösungsmittelsystem Chloroform-Methanol-konz. Ammoniak (2:2:1) unterworfen. Dabei wandert die Hauptmenge in einer Bande des R_f -Wertes von 0,92, die nach Totalhydrolyse in der Aminosäureanalyse neben wenig Asparaginsäure nur Carboxymethylcystein zeigte. Wir schließen daraus, daß das "periphere" Peptid vermutlich die Zusammensetzung



besitzt.

IV. DIE REAKTION VON JODACETAMID UND N-ÄTHYLMALEINIMID MIT SYNTHETASE

Seit den ersten Versuchen an der Fettsäuresynthetase war bekannt, daß das Enzym durch SH-Reagenzien wie Jodacetamid, N-Äthylmaleinimid, p-Chloromercuribenzoat und Arsenit gehemmt wird (15). Insbesondere NÄM und JAA gewannen an Interesse, da sich herausstellte, daß sie in etwas verschiedener Weise das Enzym inhibierten (16,17). Diese Reaktionen sollten nun quantitativ untersucht werden.

Während wir in den Versuchen von Kapitel II dem Enzym durch Zeitdauer und Konzentration des Hemmstoffes Gelegenheit gegeben hatten, mit allen verfügbaren Gruppen zu reagieren, mußte beim Verfolgen der Inhibierung der enzymatischen Reaktion nach einer ersten Reaktion, gleichgültig ob mit der "peripheren" oder der "zentralen" Gruppe, das Enzym für die Fettsäuresynthese unbrauchbar geworden sein, d.h. man fordert theoretisch für die Inhibierungsreaktionen einen bimolekularen Verlauf.

1. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der enzymatischen Inhibierung und ihre pH-Abhängigkeiten

Die Methodik der Messung war sehr einfach. SH-freie, gepufferte Enzymlösung wurde zur Zeit t_0 mit einer bestimmten Konzentration Hemmstoff versetzt und zu den Zeiten t Aliquote der Lösung mit einem Überschuß Cystein versetzt. Man stoppt damit die Inhibierungsreaktion ab und mißt im optischen Standardtest für Synthetase die verbliebene Restaktivität (siehe exp. Teil S.121).

Für eine bimolekulare Reaktion gilt folgende Geschwindigkeitsbeziehung:

$$(Gl. 24) \quad \frac{-d[A]}{dt} = k \cdot [A] \cdot [B]$$

$$(Gl. 25) \quad \frac{1}{[B_0] - [A_0]} \cdot \ln \frac{[A_0] \cdot [B]}{[B_0] \cdot [A]} = k_2 \cdot t$$

A_0 und B_0 sei die Enzym- bzw. Jodacetamid-Konzentration zum Zeitpunkt 0, A und B die Konzentrationen zur Zeit t. Durch die Tatsache, daß JAA in rund 1000-fachem Überschuß gegenüber dem Enzym vorliegt, ergibt sich folgende Vereinfachung:

$$(Gl. 26) \quad \frac{1}{[JAA]} \cdot \ln \frac{100}{x} = k_2 t$$

In dieser Gleichung ist der Ausdruck A_0/A durch das Verhältnis der gemessenen Aktivität ersetzt, d.h. x sind die Prozent Restaktivität zum Zeitpunkt t .

Zwei Forderungen sind aufgrund Gleichung 26 beim Zutreffen des bimolekularen Mechanismus zu stellen:

- Der Logarithmus der Restaktivität, gegen die Zeit aufgetragen, muß eine Gerade ergeben (Abb. 44 und 45).
- Die jeweilige Steigung dieser Geraden, bei verschiedenen Hemmstoff-Konzentrationen gemessen, muß, gegen diese aufgetragen, wiederum linearen Verlauf zeigen. Dessen numerische Auswertung liefert dann die Zahlengröße der Geschwindigkeitskonstanten k_2 (Abb. 46).

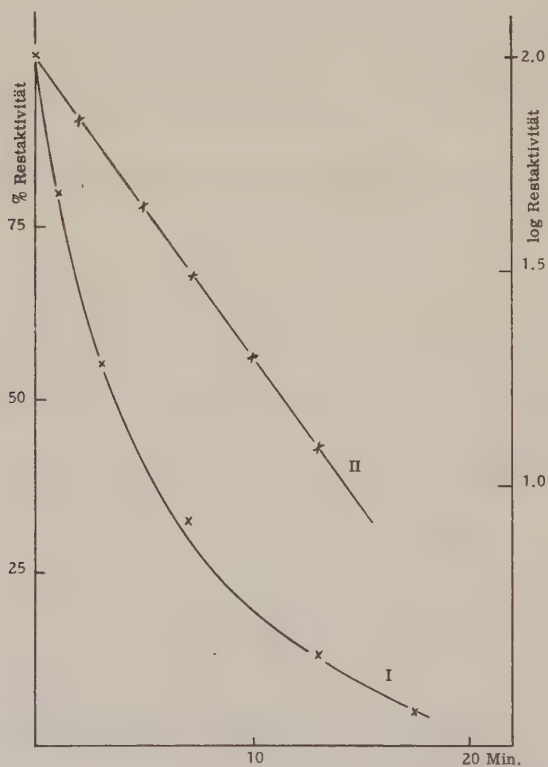


Abbildung 44 Kinetik der Inhibierung von Synthetase durch Jodacetamid
JAA: $2 \cdot 10^{-3}$ M, pH 6.5; Ausführung s. exp. Teil S. 138

- Normalauftragung (linke Ordinatenkala)
- Halblogarithmische Auftragung von I (rechte Ordinatenkala)

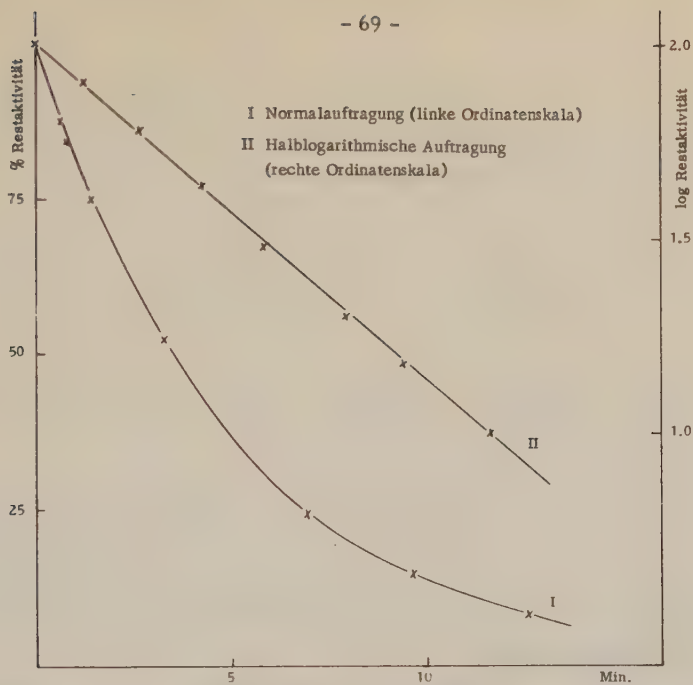


Abbildung 45 Kinetik der Inhibierung von Synthetase durch N-Äthyl-Maleinimid NÄM; 1×10^{-3} M pH 7.0; Ausführung s. exp. Teil S. 138

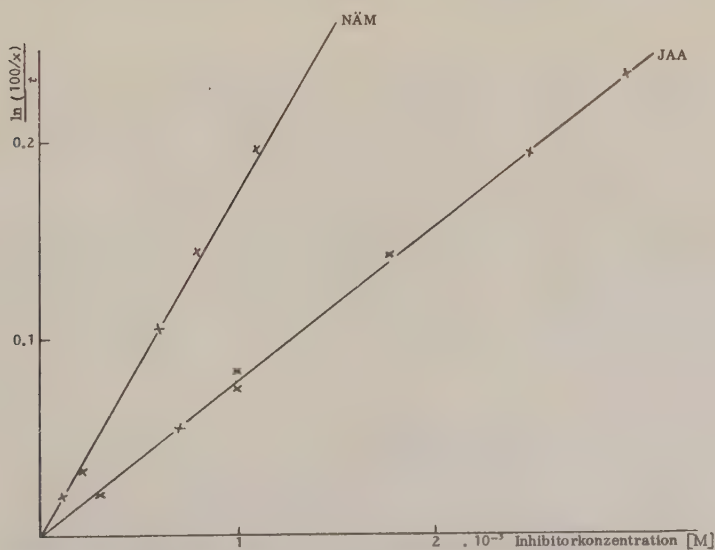


Abbildung 46 Die bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten der JAA- und NÄM-Inhibierungsreaktion

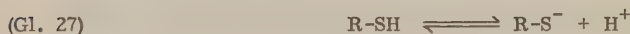
Die Abbildungen 44, 45 und 46 zeigen das Ergebnis unserer Messung. Sowohl für JAA wie für NÄM gelten die oben abgeleiteten Geschwindigkeitsbeziehungen, wenn die Hemmstoffkonzentration genügend hoch ist (d.h., Gleichung 26 trifft zu). Die numerischen Werte lauten:

$$k_2(\text{JAA}) = 78 \pm 12 \text{ (litr/Mol} \cdot \text{min)}$$

$$k_2(\text{NÄM}) = 173 \pm 26 \text{ (litr/Mol} \cdot \text{min)}$$

Es reagiert also N-Äthylmaleinimid etwa doppelt so schnell mit der Synthetase in einer die enzymatische Aktivität inhibierenden Reaktion wie Jodacetamid.

RABIN (43) hat für einige Enzyme, wie etwa Ficin, an deren Katalyse SH-Gruppen des Proteins teilnehmen, gezeigt, daß die Inhibierung durch Jodacetamid pH-Abhängigkeit aufweist. Dies ist zu erwarten, weil auch die Reaktion von Jodacetamid mit einfachen Thiolen wie Cystein pH-abhängig ist (44). Der Reaktion des Mercaptid-Ions ist Dissoziation des Thiols vorgeschaltet:



Andere SH-Enzyme wie Alkoholdehydrogenase (Hefe) und Creatin-Phosphokinase zeigen jedoch keine pH-Abhängigkeit ihrer Inaktivierung durch Jodacetamid. Zur Erklärung nimmt RABIN an, daß in diesen Fällen durch Beteiligung benachbarter Aminosäuren, vermutlich basischer eines entsprechenden p_K -Wertes, eine Art präformiertes Thiolanion vorliegt, welches dann mit Jodacetamid in einer pH-unabhängigen Reaktion zum inaktivierten Enzym reagieren würde. Abbildung 47 deutet diesen Sachverhalt schematisch an:

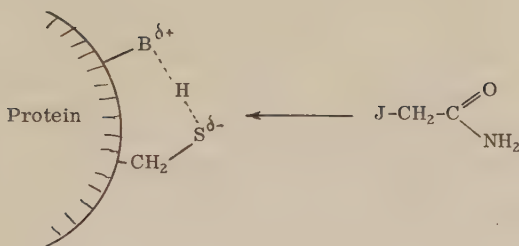


Abbildung 47 Schematische Erklärung einer prädissoziierten Thiolgruppe

Wir konnten in Analogieversuchen für die Synthetase zeigen, daß auch sie mit JAA eine derartige pH-unabhängige Reaktion eingeht. Im pH-Bereich von 5-9 tritt keine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit ein. Da Jodacetamid nicht mit der "zentralen" SH-Gruppe reagiert, wie man aus den Messungen HAGENs entnehmen kann (16), der als Hydrolyseprodukt von C^{14} -Carboxamidomethyl-Synthetase kein Carboxylmethylcysteamin fand, muß man diese Eigenschaft des präformierten Mercaptid-Ions der "peripheren" SH-Gruppe zuordnen.

Interessant war es nun, den gleichen Versuch für NÄM auszuführen, welches ebenfalls mit Thiolen in einer pH-abhängigen Reaktion reagiert (45). Voraussetzung für die Messung war allerdings der Beweis, daß für die Geschwindigkeit der Inhibierung die Reaktion von NÄM mit der "zentralen" SH-Gruppe und nicht mit der "peripheren" maßgebend ist. Auf Seite 26 ist erwähnt, daß Malonyl-CoA von der Synthetase mit geringer Geschwindigkeit (Zahlen vgl. S. 78) decarboxyliert wird und der am Enzym entstandene Acetat-Rest mit einem weiteren Molekül Malonyl-CoA zu einem Acetoacetyl-Rest reagiert. Für die Gleichgewichtsmessungen hatten wir diesen nach Analyse in Abzug gebracht.

Versuche von SCHWEIZER, in denen er erstens im Pepsinhydrolysat von Malonyl-Enzym nur den Thioester des "zentralen" Peptides, nicht aber den des "peripheren" fand, und zweitens unveränderte Mengen Thioester nach Jodacetamid-Einwirkung machen es sicher, daß der Malonyl-Rest nicht auf die "periphere" SH-Gruppe des Enzyms übertragen werden kann. Da andererseits bei Beladung des NÄM-gehemmten Enzyms kein

Thioester, aber unverändert viel Malonyl-X-Gruppen-Peptide gefunden wurden (vgl. S.48), muß die Decarboxylierung von Malonyl-CoA an der "zentralen" SH-Gruppe stattfinden, wenn man Hemmung dieser Aktivität durch NÄM findet.

Wenn man nun die Inhibierung der Fettsäuresynthese durch eine bestimmte NÄM-Konzentration mißt, sowie bei der gleichen Konzentration die Hemmung der Decarboxylierung und Kongruenz der beiden Kurven, wie dies in Abbildung 48 der Fall ist, findet, kann als erwiesen gelten, daß NÄM in der Inhibierungsreaktion mit der "zentralen" und nicht der "peripheren" SH-Gruppe des Enzyms reagiert.

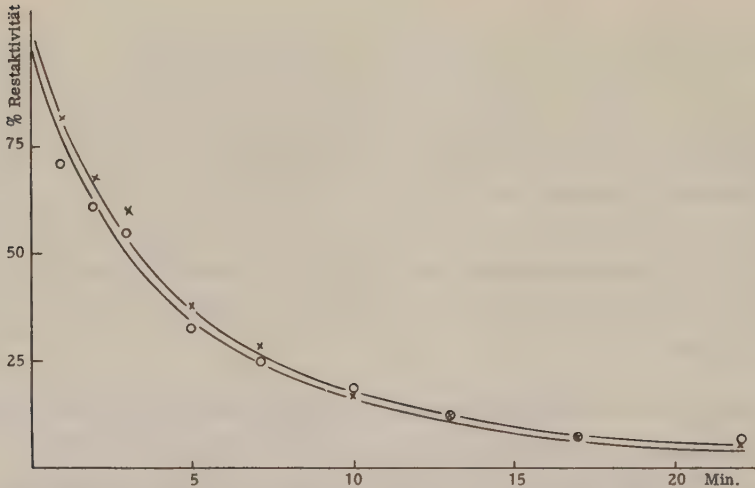


Abbildung 48 Hemmung der Fettsäuresyntheseaktivität (x — x — x) und Decarboxylierung von Malonyl-CoA (o — o — o)

M/10 KPO₄ pH 6.5; 9 mg/ml Enzym (340 mE/mg); 10⁻³ M NÄM; T = 0°C; V = 1.1 ml; zu den Zeiten der Abszisse werden 0.1 ml in 0.6 ml Stopplösung (M/10 KPO₄ pH 6.5; M/30 Cystein) pipettiert und von Aliquoten der Standard-Enzymtest (S.121) bzw. der Decarboxylierungstest (S.138 Methode I) ausgeführt.

Nachdem die oben erwähnte Voraussetzung geschaffen war, konnte in der pH-Abhängigkeit der NÄM-Reaktion mit Synthetase das Verhalten der "zentralen" SH-Gruppe studiert werden. Das Ergebnis, dargestellt in Abbildung 49, zeigt eine Steigerung der Geschwindigkeit um das Hundertfache, wenn der pH-Wert von 5 auf 10 verändert wird.

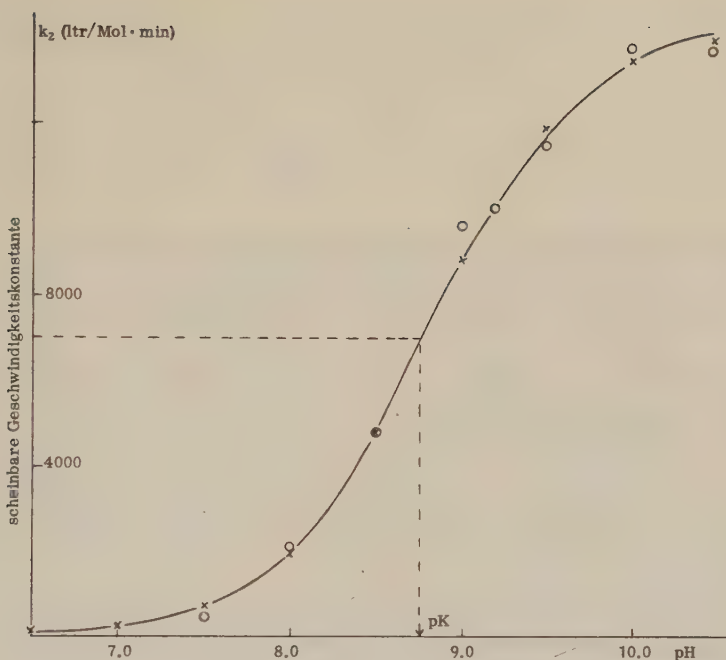


Abbildung 49 pH-Abhängigkeit der NÄM-Inhibierung

Zur Ausführung s. exp. Teil S. 138

o — o — o gemessene Kurve

x — x — x theoretische Kurve für pK 8,75 und k_2
= 14000 ltr/Mol·min

Da, wie auf Seite 70 oben ausgeführt, für das scheinbare Ansteigen der Geschwindigkeitskonstanten das vorgelagerte Gleichgewicht der Dissoziation der Sulfhydrylgruppe verantwortlich ist, kann man nach folgenden Beziehungen eine theoretische Kurve mit der experimentell gemessenen Kurve vergleichen:

$$(Gl. 29) \quad v = k_2 \cdot [NÄM] \cdot [ES^-]$$

$$(Gl. 30) \quad \frac{[H^+][ES^-]}{[ESH]} = K; \quad [ESH] + [ES^-] = [ESH_t]$$

$$(Gl. 31) \quad [ES^-] = \frac{K [ESH_t]}{[H^+] + K}$$

$$(Gl. 32) \quad v = k_2' [NÄM] [ESH_t] \cdot \frac{K}{[H^+] + K}$$

Andererseits ist:

$$(Gl. 33) \quad v = k_2 [N\dot{A}M] \cdot [ESH_t]$$

so daß:

$$(Gl. 34) \quad k_2 = k'_2 \cdot \frac{K}{K + [H^+]}$$

In den Gleichungen bedeuten k'_2 die pH-unabhängige Geschwindigkeitskonstante, k_2 die gemessene pH-abhängige Konstante, $[ESH_t]$ die eingesetzte (totale) Enzymmenge, K die Dissoziationskonstante der SH-Gruppe und $[H^+]$ die Wasserstoffionenkonzentration.

Die experimentelle Kurve ^{*)} deckt sich innerhalb der Fehlergrenze mit einer theoretischen Kurve, berechnet für einen p_K -Wert von 8.75 und $k'_2 = 14000$ (ltr/Mol · min). Dieser p_K -Wert liegt innerhalb des für die Dissoziation einer SH-Gruppe bekannten Bereiches. Der Befund ist insofern interessant, als damit der Nachweis einer frei dissoziierbaren SH-Gruppe und einer prädissoziierten SH-Gruppe im gleichen Enzym-Molekel gelungen ist.

2. Die Malonyl-CoA-Decarboxylase als Produkt der Inhibierung von Fettsäuresynthetase durch Jodacetamid

Reagiert die Fettsäuresynthetase unter den in Kapitel IV 1 geschilderten Bedingungen mit Jodacetamid, so erleidet ihre enzymatische Aktivität eine spezifische Änderung. Die fettsäuresynthetisierende Aktivität verschwindet, und es tritt an ihre Stelle eine Malonyl-CoA-decarboxylierende Aktivität:



Bei der Untersuchung dieses überraschenden Befundes fanden wir, daß diese neue Aktivität die katalytische Decarboxylierung von Malonyl-CoA nach Gleichung 34a bewirkt:

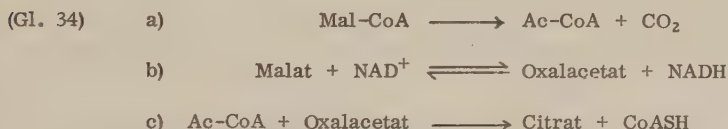


^{*)} In Abbildung 49 ist nicht sichtbar, daß die experimentelle Kurve unterhalb pH 7 von der theoretischen Kurve nach oben abweicht. Es kann dies von einer Reaktion von undissoziiertem RSH mit $N\dot{A}M$ herrühren oder vielleicht von einer Reaktion der "peripheren" SH-Gruppe.

Zu der auf Seite 26 bzw. 71 geschilderten langsamen Decarboxylierungsreaktion von Malonyl-CoA durch ungehemmte Synthetase ergeben sich zwei bedeutsame Unterschiede:

Erstens läuft Reaktion 34a etwa 200mal schneller ab und zweitens ist Produkt der Reaktion Acetyl-CoA.

Für Routinemessungen von Reaktion 34a konnte deshalb eine optische Meßmethode angewendet werden, in der die Decarboxylierungsreaktion mit zwei Folgereaktionen gekoppelt wird (Methode III S.139) nach Gleichung 34b:



Sorgt man für einen Überschuß von Malat, NAD^+ und der beiden Hilfsenzyme Malatdehydrogenase und Citratsynthase so wird Reaktion 34a geschwindigkeitsbestimmend und das entstehende NADH ein Maß ihrer Geschwindigkeit. Abbildung 50 zeigt eine mit dieser Methode aufgenommene Zeitabhängigkeit der Reaktion.

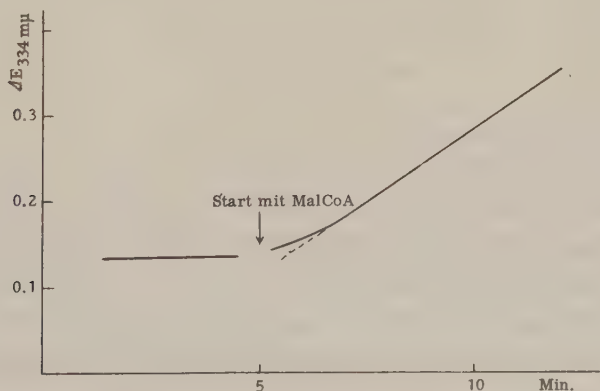


Abbildung 50 Gekoppelter optischer Test für die Malonyl-CoA-Decarboxylase 116; Synthetase (mit 10^{-3} M JAA 15 Min. bei 0°C vorbehandelt); Start mit $0.2 \mu\text{Mol}$ Mal-CoA; $T = 25^\circ\text{C}$. Beobachtung der Extinktionsänderung bei $334 \text{ m}\mu$; zur Ausführung siehe exp. Teil S.139 Methode III.

Eine Induktionsperiode für die ersten Minuten nach Start mit Malonyl-CoA konnte durch Einsatz größerer Hilfsenzymmengen verkürzt, wenn auch nicht ganz zum Verschwinden gebracht werden. Die theoretische Deutung dieser Art von Umsatzkurve ist möglich (46) und tritt besonders bei Reaktionen mit mehr als einem Hilfsenzym auf. Als Maß der Aktivität gilt der lineare Bereich der Zeitabhängigkeit.

Eine Fehlerquelle des gekoppelten Enzymtestes ist die katalytische Oxidation des im Verlauf des Testes entstehenden NADH durch Synthetase. Vermutlich aus diesem Grund konnten auch nur etwa 70 % des eingesetzten Malonyl-CoA durch entstandenes NADH nachgewiesen werden. Bei pH 8.1 liegt maximale Aktivität dieser Decarboxylase bei etwa 25 % der Fettsäuresyntheseaktivität (beide Aktivitäten ausgedrückt in $\mu\text{Mol Mal-CoA/mg Enzym} \cdot \text{min}$). Im folgenden ist als Decarboxylase die mit Jodacetamid bis zum vollständigen Verlust der Fettsäuresyntheseaktivität vorinkubierte Synthetase bezeichnet.

Eine zweite Möglichkeit der Aktivitätsbestimmung ist die Messung von entstandenem CO_2 in einer Warburg-Apparatur, die zwar größere Enzym- und Substratmengen erfordert, andererseits aber eine Messung bei pH 6.5 ermöglicht. Es zeigte sich, daß das Verhältnis von Decarboxylaseaktivität zu Fettsäuresyntheseaktivität bei pH 6.5 den Wert 0.17, bei pH 8.1 den Wert 0.25 besitzt.

Eine Bestimmung der Michaelis-Konstanten für das Enzym wurde aus experimentellen Schwierigkeiten nicht durchgeführt, doch liegt sie in der Größenordnung der Michaelis-Konstanten für die Fettsäuresynthese (K_M von Malonyl-CoA für Synthetase), da im Sättigungsbereich für die Fettsäuresynthese durch Erhöhung der Substratkonzentration keine Steigerung der Decarboxylierungsgeschwindigkeit mehr zu erreichen war.

Erstaunlich gering ist die Stabilität der Decarboxylase.

Vom Zeitpunkt des Abstoppens der Reaktion zwischen Jodacetamid und Synthetase mit einem Thiol-Überschuß an gemessen, sank die Decarboxylaseaktivität im Verlauf von einigen Stunden kontinuierlich und irreversibel ab (Abb. 51 I). Ein Abstoppen mit Thio-glykol bewirkt raschere Inaktivierung als Abstoppen mit Cystein (Abb. 51 II). Irreversible Hemmung erleidet die Decarboxylase auch durch $10^{-3} \text{ M N-Äthylmaleimid}$.

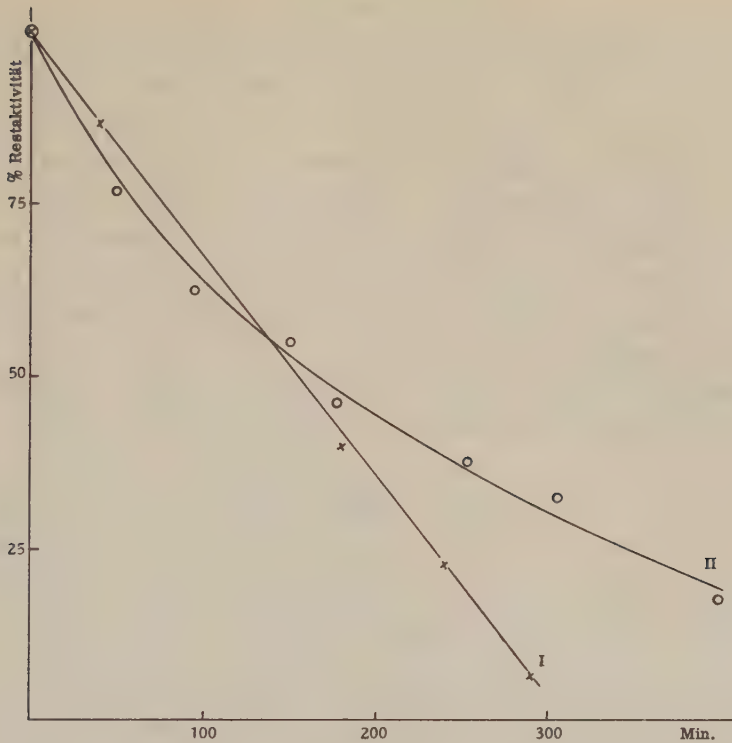


Abbildung 51 Zeit-Inaktivierung der Decarboxylase

I: in M/100 Thioglykol

II: in M/100 Cystein

Untersucht man die Bildungsgeschwindigkeit der Decarboxylase, indem man der Inkubationsmischung von Jodacetamid und Synthetase zu bestimmten Zeiten Aliquote entnimmt und nach Abstoppen dem gekoppelten Decarboxylase-Test unterwirft, so kann man aus dem Verlauf der Kinetik, wie auf Seite 67 ausgeführt, eine bimolekulare Geschwindigkeitskonstante ermitteln. Sie ergibt sich zu $k_2 = 83 \text{ (litr/Mol} \cdot \text{min)}$, d.h., die Decarboxylase entsteht mit der gleichen Geschwindigkeit, mit der die "periphere" SH-Gruppe mit Jodacetamid reagiert (vgl. S. 70). Damit bietet sich zur Erklärung ihrer Aktivität folgender Mechanismus an:

Im Falle des ungehemmten Enzyms (vgl. Abb. 20 S. 27) wird Malonyl-Enzym langsam decarboxyliert, der entstehende Acetat-Rest auf die "periphere" SH-Gruppe übertragen und mit einem zweiten, auf die "zentrale" SH-Gruppe übertragenen Malonyl-Rest zum

Acetoacetyl-Rest kondensiert. Dieser kann infolge der Abwesenheit von NADPH nicht weiter umgesetzt werden, so daß der Effekt der Decarboxylierung zum Erliegen kommt. Nur in dem Maße, wie Acetoacetyl-Enzym spontan hydrolysiert, wird eine "zentrale" SH-Gruppe zur Übernahme eines neuen Malonyl-Restes und damit zur Decarboxylierung befähigt. Man fordert bei Richtigkeit dieser Annahme, daß der Zeitverlauf der Decarboxylierung durch das ungehemmte Enzym nach einem steilen Anfang in eine Gerade umbiegt, deren Extrapolation auf die Abszisse in etwa mit einer Entwicklung von 6 $\mu\text{mol C}^{14}\text{O}_2$ pro 2,3 mg Enzym zusammentrifft (Abb. 52). Denn erst bei der Beladung mit 3 Acetoacetyl-Resten entsprechend 6 C^{14}O_2 wird die Acetoacetyl-Enzymhydrolyse geschwindigkeitsbestimmend.

Des weiteren muß die Steigung der Geraden in Abbildung 52 mit der Geschwindigkeit der Acetoacetyl-Enzymhydrolyse übereinstimmen. Die Werte betragen bei 0°C :

$$v = 0.04 \frac{\text{AcAcE hydrolysiert}}{\text{mg Enzym} \cdot \text{min}} \quad (\text{S. 7})$$

$$v^*) = 0.03 \frac{2 \text{ C}^{14}\text{O}_2 \text{ befreit}}{\text{mg Enzym} \cdot \text{min}} \quad (\text{Abb. 52})$$

(bzw. 0.55 bei 25°C)

Im Falle des gehemmten Enzyms kann der an der "zentralen" SH-Gruppe entstandene Acetyl-Rest nicht auf die "periphere" SH-Gruppe übertragen werden, damit auch nicht kondensieren, und verläßt das Enzym unter Rückübertragung auf Coenzym A mit der Geschwindigkeit der Übertragungsreaktionen. Nach diesem Bild stellt die Decarboxylierung von Malonyl-CoA die Analogie der Kondensationsreaktion unter Beteiligung eines Protons anstelle des Acetyl-Restes dar. Der Richtigkeit dieser Annahme stand nur noch ein experimenteller Befund entgegen:

Die Fettsäuresynthese verläuft mit Mal-CoA allein nur mit sehr geringer Geschwindigkeit ab (1.6-2.2 mE/mg), müßte jedoch, da ja genügend NADPH zur Reduktion des "blockierenden" Acetoacetyl-Restes vorhanden ist, zumindest die Größenordnung der Synthese mit Beteiligung von Acetyl-CoA (1600-2500 mE/mg) erreichen. Wir kommen auf diesen Widerspruch und seine Auflösung auf Seite 95 zurück.

*) Nach den auf Seite 39 erwähnten Versuchen bildet Synthetase auch Triacetolacton in einer langsamen Reaktion in Abwesenheit von NADPH. Ein Acetoacetat-Rest kondensiert anstelle eines Acetat-Restes mit Malonat. Um diesen Wert müßte die Decarboxylierung schneller verlaufen als die AcAcE-Hydrolyse. Da die beiden Größen an Präparaten verschiedener spezifischer Aktivität gemessen wurden, verschwindet die Geschwindigkeit der Triacetolactonbildung vermutlich im Fehler der Bestimmung.

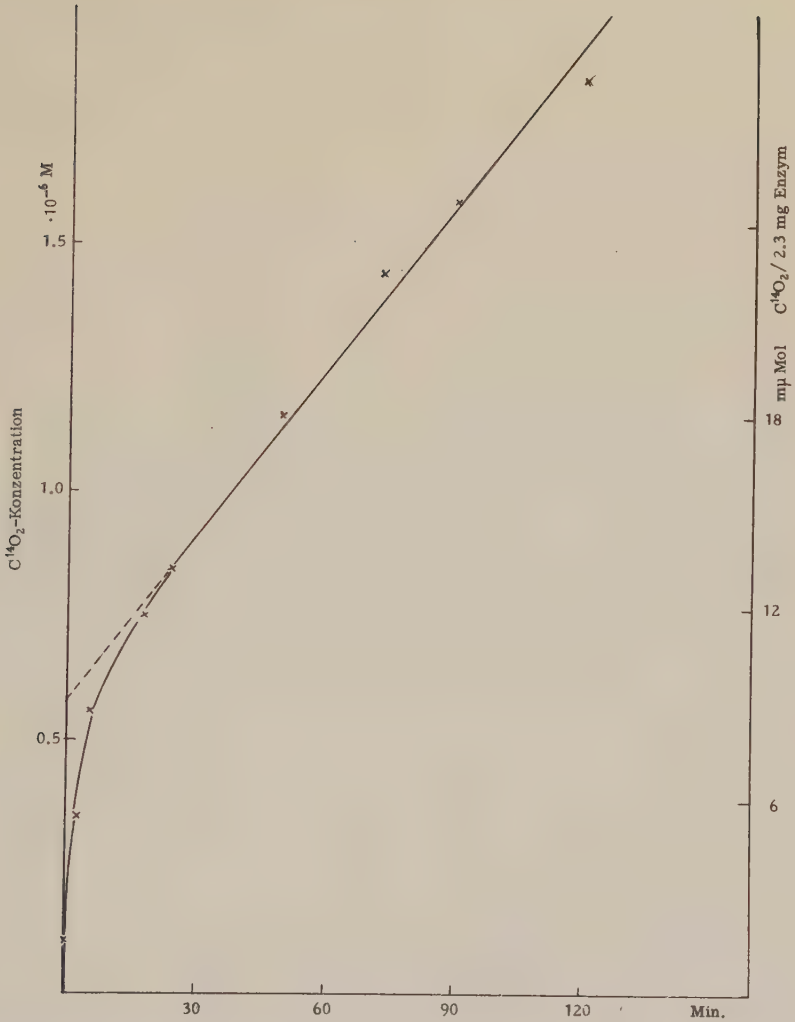


Abbildung 52 Kinetik der Decarboxylierung von 3- C^{14} -Malonyl-CoA durch ungehemmtes Enzym; zur Ausführung s. exp. Teil S. 138 Methode I

M/5 KPO_4 pH 6.5; M/100 Cystein; 1,66 mg/ml Enzym (350 mE/mg); $4,88 \times 10^{-5} M$ Mal-CoA; V = 0,5 ml; T = 0°C;

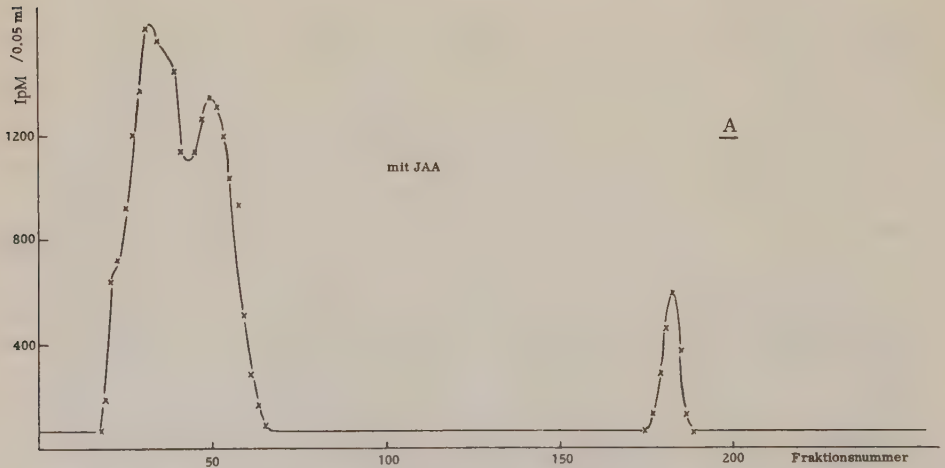
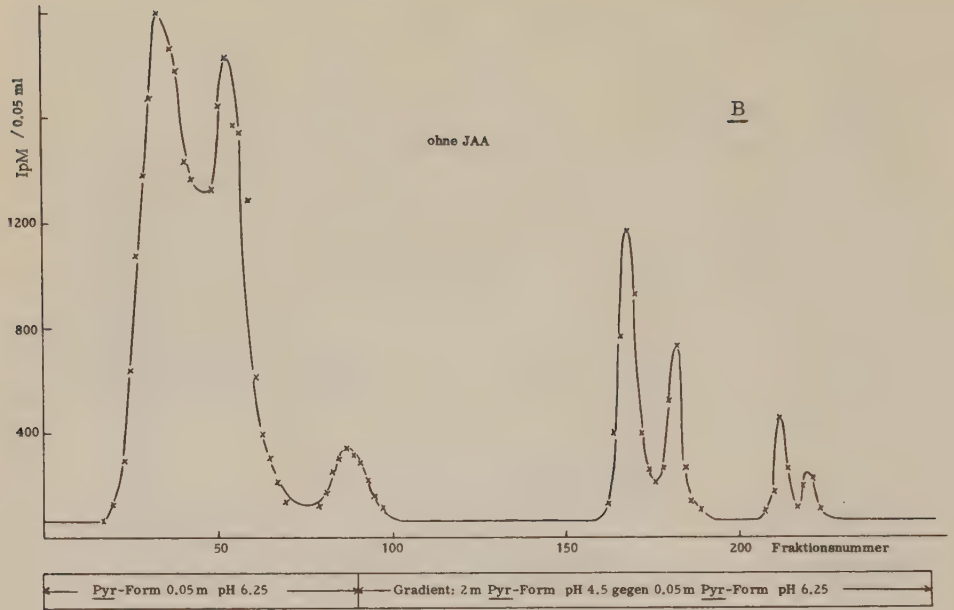


Abbildung 53 DEAE-Sephadex-Chromatographie des peptischen Hydrolysates von C^{14} -Acetyl-Synthetase mit (A) und ohne (B) Jodacetamid-Vorinkubation

zur Ausführung s. exp. Teil S. 129 ff

Versuchsdaten: Ansatz V Tabelle 8; Hemmung: $2,5 \times 10^{-3}$ JAA 10 min, 0°C , danach keine enzymatische Aktivität mehr; Stop mit M/100 Cystein

3. Die Konkurrenz von Acetyl-Coenzym A und Jodacetamid um die "periphere" SH-Gruppe der Synthetase

Aufgrund der geschilderten Ergebnisse erwartet man eine eindeutige Konkurrenz von Jodacetamid und Acetyl-CoA um die "periphere" SH-Gruppe. Experimentell läßt sich dieser Sachverhalt unter anderem durch den Schutz der enzymatischen Aktivität mit Acetyl-CoA gegen die Inhibierung durch Jodacetamid prüfen. Dieser Schutz war in früheren Versuchen nicht gefunden worden (17), und so versuchten wir zunächst einen direkten Beweis der Konkurrenz durch Peptidanalyse, deren Methodik in Kapitel III, 4 beschrieben ist, zu erbringen. In Parallelansätzen, auf deren identische Behandlung streng geachtet wurde, wurde jeweils JAA-vorbehandeltes Enzym und nicht vorbehandeltes Enzym mit C^{14} -Acetyl-CoA beladen. Nach peptischer Spaltung wurden die Peptidhydrolysate auf DEAE-Sephadex-Säulen aufgetragen, die über ein T-Stück an dasselbe Elutionsgefäß angeschlossen waren. Bei sorgfältigem Arbeiten erreicht man die Elution gleicher Gipfel im gleichen Fraktionsbereich. Abbildung 53 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs.

Wie erwartet verschwinden die Gipfel DEG_3 , DEG_4 und DEG_6 . Um zu zeigen, daß auch der Hauptthioestergipfel DEG_1CMG_1 nach Jodacetamidbehandlung des Enzyms fehlt, war die CM-Sephadex-Chromatographie notwendig, die diesen Gipfel von den Nichtthioestergipfeln abtrennt (Abb. 54).

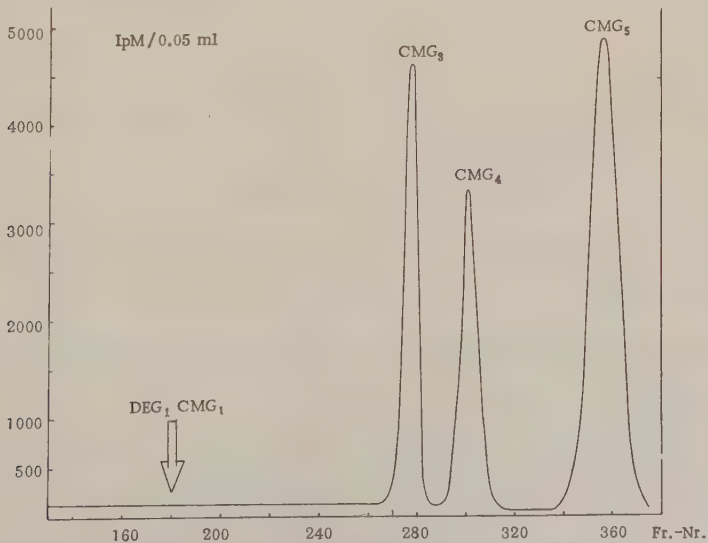


Abbildung 54 (zur Versuchsausführung vgl. Abb. 35)

Durch dieses positive Ergebnis ermutigt, wiederholten wir die Acetyl-CoA-Schutzversuche und fanden eine erhebliche Schutzwirkung von 75-80 % (Abb. 55).

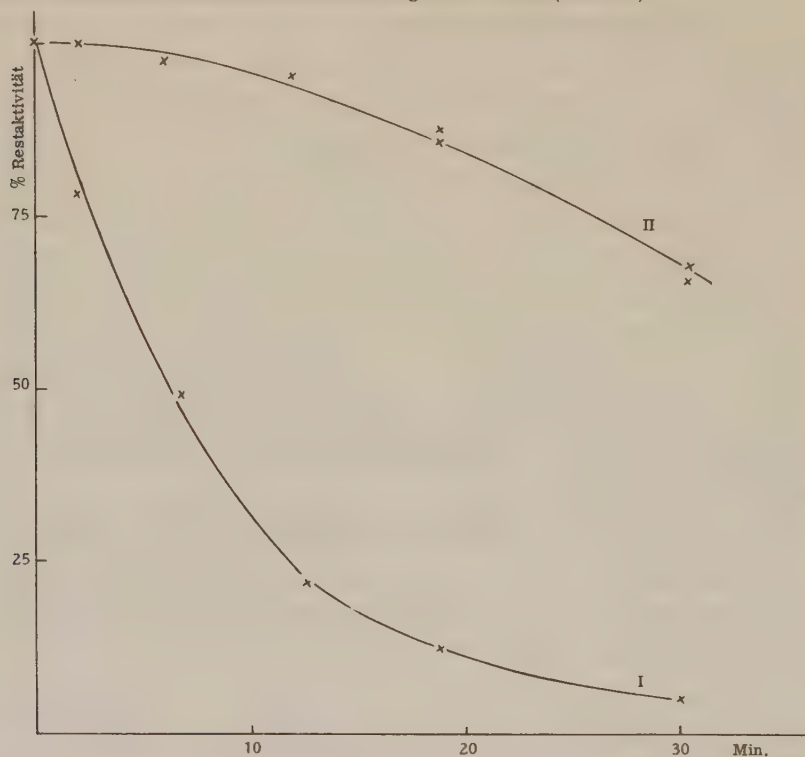


Abbildung 55 Schutz der Synthetase durch Acetyl-CoA vor JAA-Inhibierung (1×10^{-3} M)

I: ohne Acetyl-CoA

II: mit 10^{-3} M Acetyl-CoA, CoASH-frei
zur Ausführung s. exp. Teil S. 139

Wir gingen nun dazu über, durch Reaktion der Synthetase mit C^{14} -Jodacetamid die radioaktiv markierten Peptide mit denen von C^{14} -Acetylsynthetase zu vergleichen.

4. Beladung der Synthetase durch C^{14} -Jodacetamid und Proteolyse des Produktes

a) Verlauf der Reaktion bei verschiedenen Temperaturen

HAGEN (16) hatte als erster gezeigt, daß die Reaktion, bei Null Grad C ausgeführt, bei einem Umsatz von etwa 3.3 Resten Jodacetamid pro Mol Synthetase stehenbleibt. Wir wiederholten diesen Versuch bei verschiedenen Temperaturen und fanden dabei

eine vom Temperaturanstieg stark beschleunigte Inkorporation von Radioaktivität. Die enzymatische Aktivität war bei allen Temperaturen nach Einbau von etwa drei Resten Jodacetamid pro Mol Synthetase auf Null gesunken. Es findet also eine die enzymatische Inhibierungsreaktion begleitende, aber sehr viel langsamere Nebenreaktion statt. Aus den Anfangsgeschwindigkeiten bei den verschiedenen Temperaturen in Abbildung 56 kann ein Arrhenius-Diagramm gebildet werden, aus dem sich die Aktivierungsenergie dieser Nebenreaktion zu 13.5 kcal ergibt.

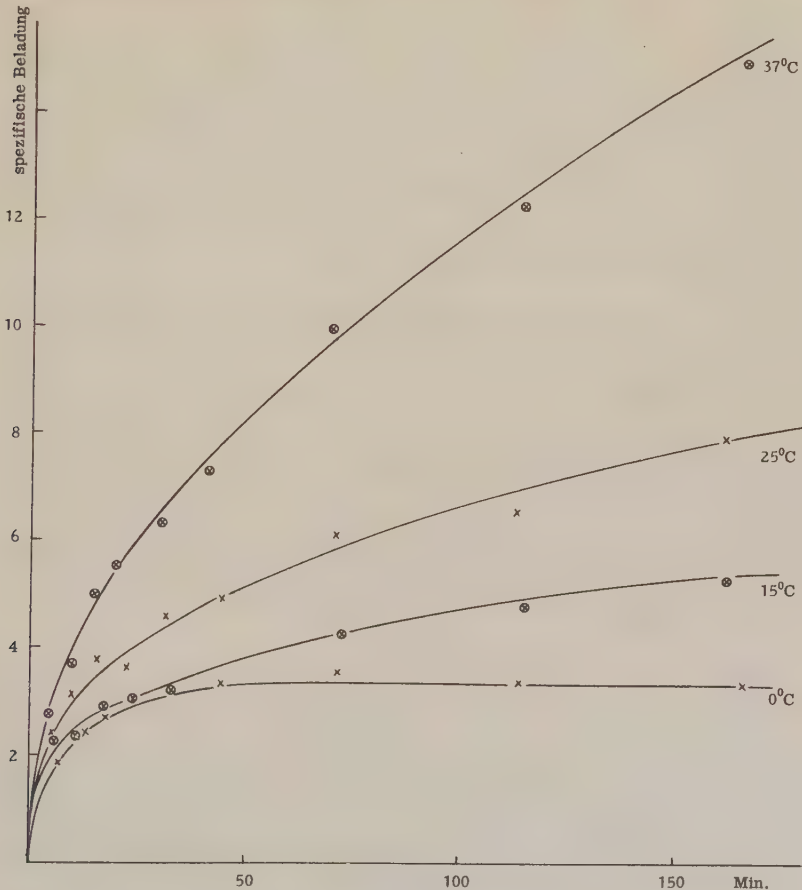


Abbildung 56 Zeitabhängigkeit der Reaktion von C^{14} -Jodacetamid mit Synthetase bei verschiedenen Temperaturen

zur Ausführung s. exp. Teil S. 139

Unsere Bemühungen, das Produkt dieser Reaktion nach salzsaurer Totalhydrolyse zu identifizieren, scheiterten bislang. Es handelt sich nicht um ein Reaktionsprodukt der Aminosäuren Cystein, Cysteamin, Lysin oder Histidin, und wahrscheinlich auch nicht Methionin, obwohl das elektrophoretische Verhalten der Substanz auf eine saure Verbindung hindeutet. (Die genannten Aminosäurederivate enthalten eine negative Überschußladung !)

b) Hydrolyse der C^{14} -Carboxamidomethyl-Synthetase durch Pepsin

Die Synthetase wurde bei der Temperatur $0^{\circ}C$ mit C^{14} -Jodacetamid inkubiert, bis die enzymatische Aktivität auf Null gesunken war. Die weitere Aufarbeitung und Chromatographie an DEAE-Sephadex erfolgte wie für die Acetylsynthetase beschrieben (Kapitel III, 4). Die C^{14} -Carboxamidomethyl-Peptide tragen verglichen mit den Acetyl-Peptiden die gleiche Ladung, man erwartet also ein gleiches oder ähnliches Verteilungsbild bei der Chromatographie an einem Anionenaustauscher.

Dies tritt auch wirklich ein, die bei den Acetyl-Peptiden (Abb. 34) als DEG_1 , DEG_3 , DEG_4 und DEG_6 bezeichneten Gipfel erscheinen auch im Elutions-Diagramm in Abbildung 57. Man beobachtet jedoch eine Verschiebung der relativen Verteilung von DEG_1 zu DEG_3 , welches hier überwiegendes Produkt ist. Da der einzige Unterschied der beiden Synthetasen in einem Carboxamidomethylcystein anstelle eines Acetylcysteins besteht, kann man wohl annehmen, daß die proteolytische Spaltung in der Nähe, wenn nicht direkt am Cysteinbaustein selbst, erfolgt (siehe S. 66) und durch die Substitution des Cystein-Restes verlangsamt wird, so daß ein Produkt mit längerer Kette, also DEG_3 , den Vorzug erhält.

c) Hydrolyse der Carboxamidomethyl-Synthetase durch Trypsin

Mit dem Versuch, Carboxyamidomethyl-Synthetase tryptisch zu spalten, waren zwei Absichten verbunden. Zum ersten war zu fordern, daß wir nur ein radioaktives Spaltstück finden würden, da Trypsin sehr selektiv nur solche Peptidbindungen spaltet, an denen sich die Carboxylgruppe eines Lysin- oder Arginin-Restes beteiligt. Zum anderen bestand die Hoffnung, mit Pepsin-Nachspaltung eines partiell gereinigten tryptischen Peptides der "peripheren" SH-Gruppe eine bessere Abtrennung der verunreinigenden Peptide zu erreichen.

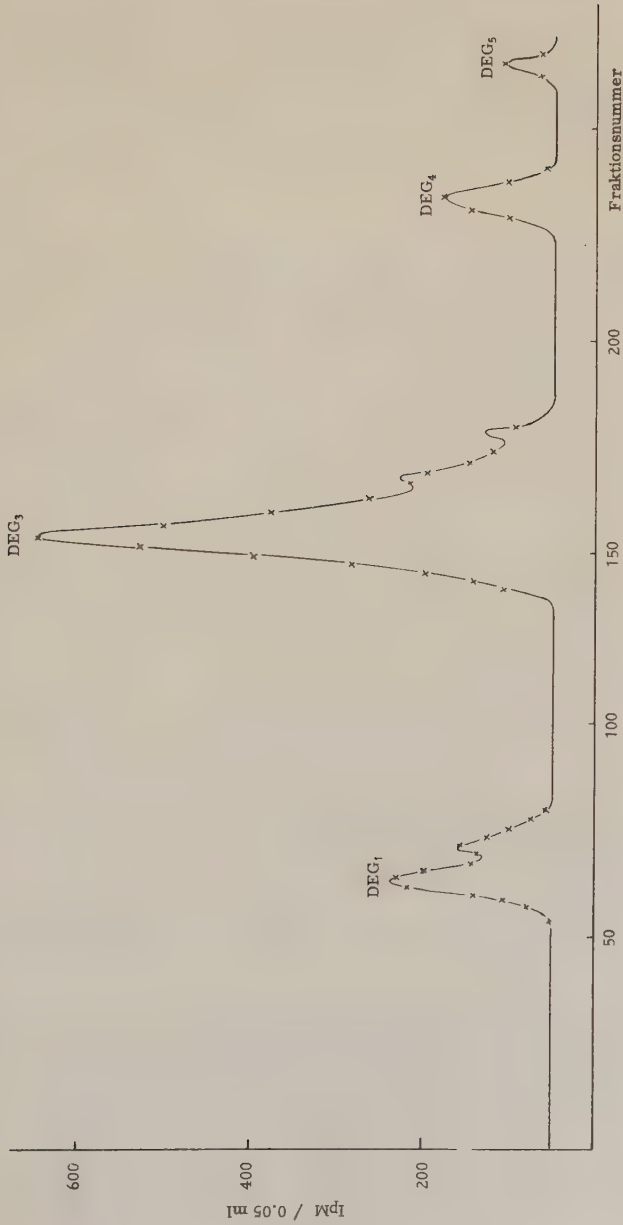


Abbildung 57 DEAE-Sephadex-Chromatographie des peptischen Hydrolysates von C^{14} -Carboxamidomethyl-Synthetase für Beladung s. expt. Teil S. 140; Aufarbeitung wie für Acetyl-Peptide beschrieben; Säule: 2 x 220 cm; Fraktions-Vol.: 2 ml; Gradient ab Fraktion 200 wie in Abb. 53

Die Zeitabhängigkeit der Trypsinspaltung sowohl reiner wie auch von Carboxamidomethyl-Synthetase wurde photometrisch verfolgt (33), indem Aliquote der Inkubationsmischung mit Ninhydrin versetzt und die entstandene Färbung nach Erhitzen bei 570 mμ gemessen wurde. Schon nach kurzer Zeit erreicht die Spaltung den aufgrund des Lysin- und Arginin-Gehaltes der Synthetase erwarteten Grad (Abb. 58).

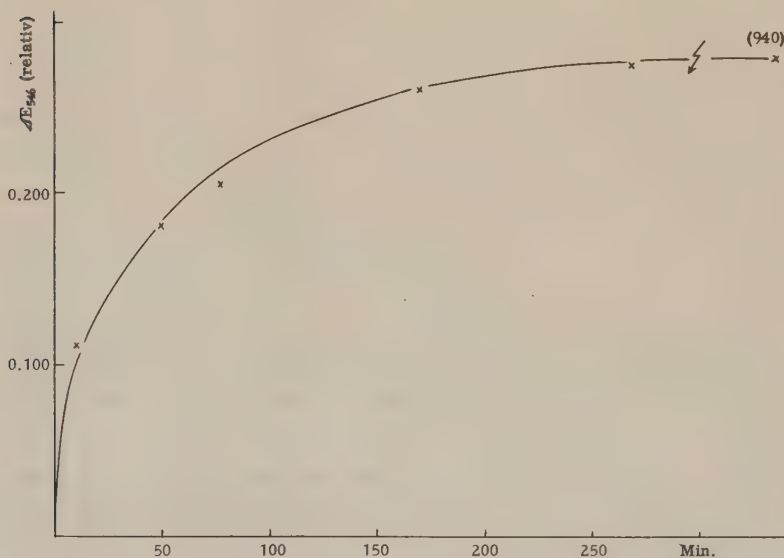


Abbildung 58 Zunahme der Ninhydrin-Extinktion bei tryptischer Spaltung von C^{14} -Carboxamidomethyl-Synthetase
zur Ausführung s. exp. Teil S. 131

Wir fanden jedoch, daß sich die radioaktiven Spaltstücke im Hydrolysat heterogen verhielten. Ein Teil des radioaktiven Materials war in 1 M Trichloressigsäure löslich (= Peptid T), während der andere Teil nicht löslich war (= Peptid T_C). Löst man T_C erneut in Puffer und versetzt mit Trypsin, so wird es im Verlauf von etwa 12 Stunden vollständig in T übergeführt, d.h. die Spaltung verläuft wie in Gleichung 35 angegeben:



Eine Sephadex G₅₀-Chromatographie, als erster Reinigungsschritt gedacht, erbrachte den Beweis der Heterogenität auch von T. Ein größeres Peptid mit einem K_d-Wert 0.45 in 50 % Essigsäure wandert, von wenig Ninhydrin-positivem Material begleitet, schneller durch die Säule und wird als T_A bezeichnet, während ein langsam-wanderndes Peptid mit der Hauptmenge Ninhydrin-positiven Materials mit einem K_d-Wert von etwa 0.8 im Eluat erscheint und als T_B bezeichnet wird.

Dieses Ergebnis war mit dem Konzept von drei Jodacetamid-Resten auf drei "peripheren" SH-Gruppen nicht zu vereinen, da man hier ein einziges Produkt erwartet. Zunächst mußte also sichergestellt werden, daß es sich bei T_A und T_B nicht um Peptidbruchstücke derselben Kette, aber verschiedenen Spaltungsgrades handelt. Da aus Sorge vor einer unspezifischen Boranatspaltung von Peptidbindungen (38) das beladene Protein nicht reduziert und carboxymethyliert worden war, bestand auch die Möglichkeit, daß T_A eine zweite, über eine Disulfidbrücke verbundene Peptidkette enthielt, während T_B nur eine mit dem C¹⁴-Carboxamidomethyl-Rest darstellte. Eine dritte Erklärung wäre eine Verunreinigung des Trypsin-Präparates durch Chymotrypsin.

Es wurde T_A nach der Sephadex-G₅₀-Chromatographie zurückgewonnen und für weitere 60 Stunden mit Trypsin behandelt, dann erneut derselben Chromatographie unterworfen. Keinerlei Änderung zeigte sich, das gesamte Material wurde an der Stelle von T_A eluiert. Außerdem wurde das Gesamthydrolysat der PAS-Oxidation unterworfen. Diese Oxidation zerstört zwar die Seitenketten von Tryptophan und Tyrosin, läßt jedoch die Kettenlänge und damit die Größe der Moleküle unverändert. Die anschließende Sephadex G₅₀-Chromatographie zeigte, daß T_A und T_B unverändert eluiert werden, d.h. Disulfidbrücken schieden in T_A aus. Schließlich ergab eine Prüfung des Trypsin nach STEIN und MOORE (38) keine Chymotrypsinaktivität des Präparates, ebenso bewirkte ein nach Anfinnen mit HCl vorbehandeltes Präparat keine Veränderung der Menge T_A im Gemisch.

Abbildung 59 zeigt die Auftrennung der beiden Peptide in einem präparativen Ansatz nach Rechromatographie (es sind die beiden Elutionsdiagramme übereinandergezeichnet). Die Mengenverhältnisse sind etwa 3:5 = T_A:T_B. Als experimentell interessante Tatsache sei vermerkt, daß bei der Sephadex-Chromatographie für T_A starke Absorptionseffekte auftreten, die auch bei T_B, etwas abgeschwächt, beobachtet werden.

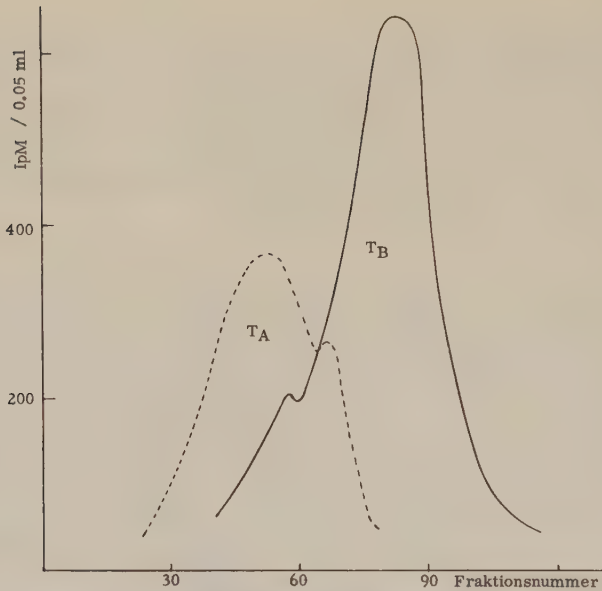


Abbildung 59 Sephadex-G₅₀-Chromatographie des tryptischen Hydrolysates von C¹⁴-Carboxamidomethyl-Synthetase

Fraktions-Vol.: 9 ml; (Beginn der Fraktionsbezeichnung nach Elution von V₀); zur Ausführung s. exp. Teil S. 140

T_A : gestrichelte Linie T_B : ausgezogene Linie

DEAE-Sephadex-Chromatographie und "Fingerprint"-Analyse (siehe exp. Teil S.140) belegten die Einheitlichkeit beider Peptide.

Das T_A -Peptid konnten wir reinigen und seine vermutliche Zusammensetzung ermitteln:

Aminosäure	Reste	Aminosäure	Reste
Asp, (-NH ₂)	4.20	Met	1.05
Thre	2.04	Ileu	2.18
Ser _{korrr} *)	3.82	Leu	3.50
Pro	2.16	Tyr**) (0.35)	
Glu, (NH ₂)	2.80	Phe	0.87
Gly	3.80	Lys	1.10
Ala	2.94	His	Spuren
Val	2.96	Arg	0
Cys	Spuren	Try**) /	

*) korrigiert auf 10 % Hydrolyseverlust

**) Tryptophan und Tyrosin konnten wegen Materialmangel nicht bestimmt werden

Es handelt sich bei T_A also um ein Peptid aus etwa 35 Aminosäuren mit einem daraus berechneten Molekulargewicht von 3700.

5. Die "schnelle" Nebenreaktion von Jodacetamid mit Synthetase

Die auf Seite 81 geschilderten Versuche hatten den eindeutigen Nachweis des Schutzes von Acetyl-CoA gegenüber Inhibierung durch Jodacetamid ergeben. Um diesen Sachverhalt quantitativ zu prüfen, wurden Versuche HAGENs wiederholt (16), in denen die Gleichzeitigkeit des Verschwindens von enzymatischer Aktivität mit dem Einbau von C^{14} -Jodacetamid festgestellt worden war. Der Zusatz von Acetyl-CoA mußte den Einbau von C^{14} -Jodacetamid unterbinden. In Abbildung 60 ist nun dem Kurvenpaar (C^{14} -JAA-Einbau und Inhibierung) ohne Zusatz von Acetyl-CoA (I und II) dieselbe Messung mit Acetyl-CoA (III und IV) gegenübergestellt.

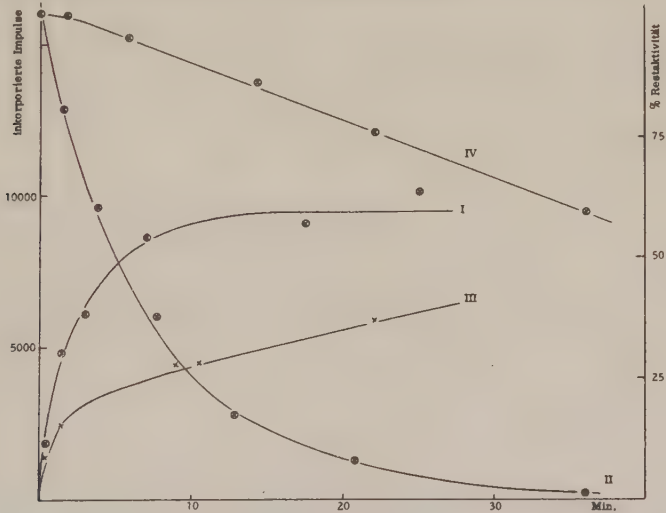


Abbildung 60 C^{14} -Einbaukurven und Verlust der enzymatischen Aktivität bei der JAA-Inhibierungsreaktion von Synthetase

ohne Acetyl-CoA-Schutz I Einbau von C^{14} -JAA (linke Ordinatenkala)

II Hemmkurve der enzymatischen Aktivität (rechte Ordinatenkala)

A: (I und II): $M/10 KPO_4$ pH 6.5; $1.8 \cdot 10^{-3} M C^{14}$ -JAA ($4.2 \cdot 10^6$ IpM/ μ Mol); 18.5 mg Enzym pro ml (1000 mE/mg); zu den Zeiten der Abszisse werden Aliquoten (entspr. 1.5 mg) in 1 ml Wasser, enthaltend 10 μ Mol Thioglykol und 10 mg Serumalbumin, pipettiert, 20 γ Aliquote in 2 ml Lösung für den enzymatischen Standardtest, mit Acetyl CoA-Schutz III wie I, IV wie II

B: (III) und IV): wie A mit $1 \cdot 10^{-3} M$ Acetyl-CoA

Während für I und II eine mögliche Identität der beiden Prozesse nicht ausgeschlossen erscheint, ist sie dies für die Kurven III und IV, die Kurven unter Acetat-Schutz also, mit Sicherheit. Das deutet auf eine schnelle, von Acetat unbeeinflusste Reaktion des Jodacetamid mit Synthetase im Verhältnis 1:1 hin, da Extrapolation von Kurve III auf die Abszisse etwa $\frac{1}{3}$ der Gesamtbeladung ergibt. Wenn es sich um keine Inhibierungsreaktion handeln sollte, erwartet man bei einer Auftragung von Restaktivität gegen spezifische Beladung eine Gerade auf der Höhe von 100 % und ab der spezifischen Beladung 1 ein lineares Abnehmen bis Null bei der spezifischen Beladung von 3. Es sei vorweggenommen, daß diese schnelle Reaktion in ihrem Verlauf gemessen werden konnte (S. 94) und wir für ihre Geschwindigkeitskonstante k_2 den Wert 1600 (litr/Mol · min) erhielten. Mit diesem Wert kann man nun den theoretischen Verlauf der Beziehung zwischen enzymatischer Restaktivität und spezifischer Beladung des Enzyms durch JAA berechnen und mit dem experimentell gemessenen vergleichen. Man sieht in Abbildung 61 die befriedigende Übereinstimmung. Für den Grenzfall eines Geschwindigkeitsunterschiedes von unendlich würde man, wie dies auch für die Lactatdehydrogenase gefunden wurde, den linearen Verlauf erwarten (45).

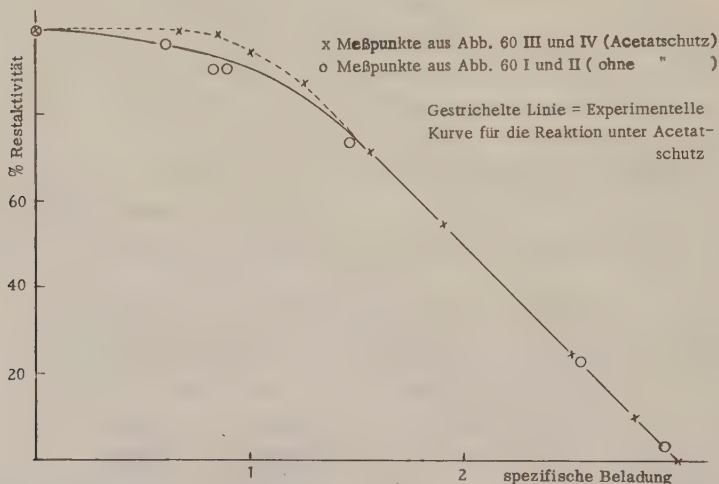


Abbildung 61 Vergleich von theoretischer Kurve und Meßdaten aus Abb. 60

Ausgezogene Linie: Theoretische Kurve, berechnet für die Überlagerung zweier Reaktionen A und B.

A: JAA reagiert mit Synthetase im Verhältnis 1:1 ohne Inhibierung der enzymatischen Aktivität und mit $k_2 = 1600$ (litr/Mol · Min).

B: JAA reagiert mit Synthetase im Verhältnis 2:1 unter Inhibierung der enzymatischen Aktivität und mit $k_2 = 80$ (litr/Mol · Min).

Bei Acetyl-CoA-Schutz wird die langsamere Reaktion noch weiter verlangsamt, so daß der Geschwindigkeitsunterschied stärker zur Ausprägung kommt (gestrichelte Linie in Abb. 61).

Es war hier die Frage zu stellen, welches Produkt die schnelle Reaktion liefert. HAGEN hatte nach salzsaurer Spaltung des beladenen Proteins Carboxymethylcystein durch Elektrophorese, Papierchromatographie und Umkristallisieren mit Träger bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität im Hydrolysat nachgewiesen (16). Das Hydrolyseprodukt der schnellen Reaktion mußte also in seinem Verhalten dem Carboxymethylcystein sehr ähnlich sein. Unterwirft man das Hydrolysat der Elektrophorese über mehrere Stunden, so erkennt man an einer, zum Start hin steiler abfallenden Radioaktivitätsverteilung, daß offenbar mehr als eine Substanz vorliegt. Die Vermutung, es könnte sich um Oxidationsprodukte des Thioäthers, also ein Sulfoxid oder Sulfon handeln, wurde geprüft, indem das Hydrolyseprodukt der Perameisensäureoxidation unterworfen wurde. Authentisches Carboxymethylcystein verändert bei dieser Behandlung seinen R_f -Wert im papierchromatographischen Lösungsmittelsystem Butanol-Eisessig-Wasser = 4:1:1 von 0.20 auf 0.05. Wurde nun das Hydrolyseprodukt von Carboxamidomethyl-Synthetase nach Oxidation in demselben System analysiert, so zeigte sich, daß zwar ein Teil mit Carboxymethylcysteinsulfon identischen R_f -Wert besaß, jedoch ein anderer Teil seinen R_f -Wert auf 0.42 erhöhte, also nicht identisch war. Diese Substanz konnte bisher nicht identifiziert werden, weder Histidin noch Lysin ergeben gleiche Carboxymethylierungsprodukte, das entsprechende Cysteaminderivat scheidet aufgrund seines elektrophoretischen Verhaltens aus.*¹) Da sie sich auch durch Vergleich mit dem Methioninderivat als nicht identisch erwies, ist es nicht ausgeschlossen, daß es sich nicht um ein Aminosäurederivat handelt.

Quantitative Versuche, das Verhältnis von Carboxymethyl-Cystein und der Verbindung mit dem R_f -Wert 0.42 im Hydrolysat zu bestimmen unternahmen wir nicht, da die Ausbeute der Aufarbeitung der unbekannten Substanz nicht durch Trägerzusatz bestimmt werden konnte.

Tabelle 10 faßt die gefundenen R_f -Werte und elektrophoretischen Mobilitäten der verschiedenen Substanzen zusammen.

*¹) Die Vergleichssubstanzen wurden freundlicherweise von Dr. U. Gehring, MPI für Zellchemie, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 10 Vergleich verschiedener Carboxymethylierungsprodukte

Derivat	Verhalten in der Papierchromatographie R_f	Verhalten in der Elektrophorese $\text{cm}^2/\text{v} \cdot \text{sec}$
Hydrolyseprodukt von C^{14} -Carboxamido- methylsynthetase	nicht oxidiert: 0.23-0.28 oxidiert: 0.05; 0.42;	nicht oxidiert: $6.4 \cdot 10^{-5}$ bis $7.6 \cdot 10^{-5}$
Carboxymethylcystein	nicht oxidiert: 0.23 oxidiert: 0.05	nicht oxidiert: $6.4 \cdot 10^{-5}$
Carboxymethyl-Lysin- Derivate	0.01; 0.04; 0.07;	$1.07 \cdot 10^{-5}$; $5.1 \cdot 10^{-5}$
Carboxymethyl-Histidin- Derivate	0.01; 0.04; 0.07;	$1.85 \cdot 10^{-5}$; $3.5 \cdot 10^{-5}$; $5.4 \cdot 10^{-5}$

Aufgrund dieser Befunde fand auch das Auftreten der zwei tryptischen Peptide T_A und T_B seine Erklärung (vgl. S. 88). Die Totalhydrolyse von Proben zeigte im T_A -Peptid nach Oxidation kein Carboxymethylcysteinsulfon, sondern die Substanz mit R_f -Wert 0.42, während das T_B -Peptid Carboxymethylcysteinsulfon mit nur Spuren der unbekannten Substanz lieferte, die sehr wahrscheinlich auf der noch nicht quantitativen Abtrennung von T_A im Gemisch beruhen.

Wenn mit diesem Befund auch einerseits das Bild vom trimeren Charakter des Synthetase-Moleküls in Frage gestellt war, besaßen wir noch keinen Einblick in die Funktion und den Sinn dieser schnellen Reaktion von Jodacetamid mit Synthetase.

Ein Versuch mit der Malonyl-CoA-Decarboxylase brachte unerwartet eine mögliche Erklärung. Ihre Aktivität kann neben der auf Seite 75 beschriebenen Methode auch durch einen gekoppelten Enzymtest gemessen werden, in dem intakte Synthetase, als Hilfsenzym im Überschuß eingesetzt wird und das entstehende Acetyl-CoA unter NADPH-Verbrauch zu Fettsäuren umgesetzt wird (Koppelung von Reaktion 34a mit Reaktion 1). Inkubiert man eine Synthetase-Lösung mit Jodacetamid, entnimmt zu bestimmten Zeiten Proben, stoppt sie mit einem Überschuß Cystein ab und mißt den NADPH-Verbrauch mit Malonyl-CoA allein (Standardtest, aber ohne Acetyl-CoA), so erwartet man zunächst ein Ansteigen der Aktivität vom relativen Nullpunkt des Umsatzes mit Malonyl-CoA

(zur Größe vgl. S. 78) allein, da ein Überschuß intakte Synthetase gegenüber durch Reaktion mit JAA entstandener Decarboxylase vorliegt. Im weiteren Zeitverlauf muß sich über einen Gipfelpunkt hinweg ein Abnehmen der Aktivität und langsames Anpassen an den Verlauf der normalen Inhibierungskinetik zeigen, da jetzt die noch vorhandene aktive Synthetase die Geschwindigkeit diktiert. Abbildung 62 bestätigt qualitativ den erwarteten Verlauf.

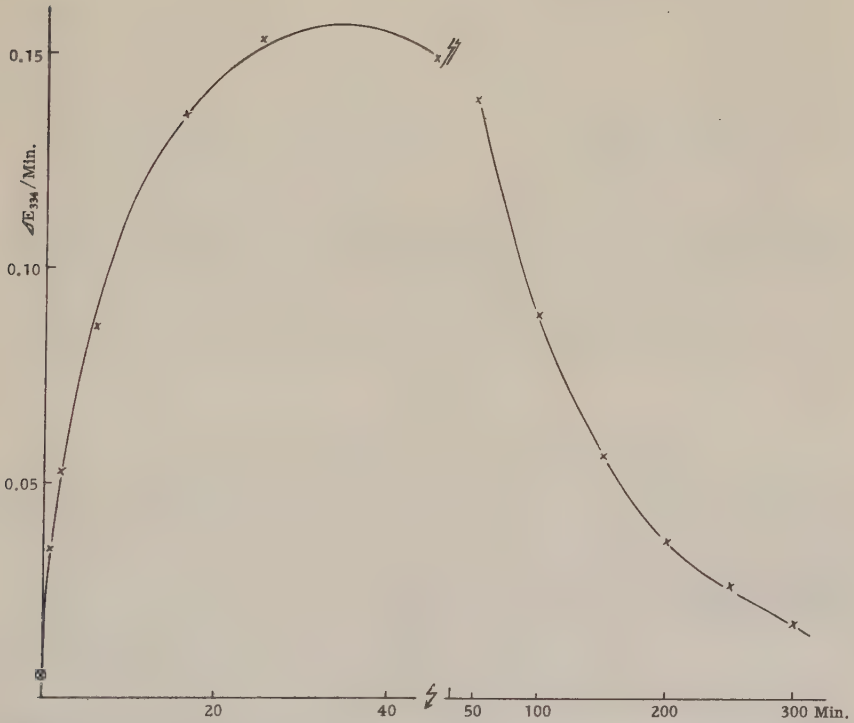


Abbildung 62 Wirkung von JAA auf die Fettsäuresynthese in Abwesenheit von Acetyl-CoA
 17.5 mg/ml Enzym (500 mE/mg) in M/10 KPO₄ pH 6.5 werden mit 10⁻⁴ M JAA bei 0°C versetzt und zu den Zeiten der Abszisse Aliquote im Standardtest (s. S.121) ohne Acetyl-CoA gemessen. ΔE für ungehemmtes Enzym mit Acetyl-CoA: 0.21/min.

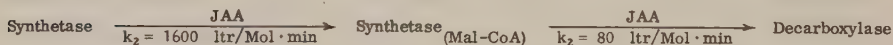
Während der absteigende Ast auch numerisch mit der Inhibierungsgeschwindigkeit von Synthetase ($k_2 = 80$) übereinstimmt, trifft dies für den aufsteigenden Ast in Abbildung 62 nicht zu. Man berechnet aus seiner Anfangsgeschwindigkeit eine bimolekulare Geschwin-

digkeitskonstante von 1600 (litr/Mol · min), d.h. eine 20mal so große Geschwindigkeit wie für den absteigenden Ast der Kurve. Dieses überraschende Ergebnis bedeutet, daß man durch Reaktion mit 10^{-4} M JAA für 25 Minuten bei 0°C die Synthetase in ein Enzym umwandeln kann, welches aus Malonyl-CoA ohne Mitwirkung von Acetyl-CoA Fettsäuren zu synthetisieren imstande ist. Die gaschromatographische Analyse der Produkte als Fettsäuremethylester zeigte in Menge und Verteilung Identität mit dem Produkt der normalen enzymatischen Reaktion. Ebenso verändert das Enzym nach der JAA-Behandlung sein Sedimentationsverhalten in der analytischen Ultrazentrifuge nicht. Wie wir erwartet hatten, zeigte es sich jedoch, daß die beschriebene Funktionsänderung der Synthetase mit dem Einbau von 1-2 Mol JAA pro Mol Synthetase parallel läuft und die Geschwindigkeiten der beiden Prozesse gleich sind. Es handelt sich also um die auf Seite 90 beschriebene, von Acetyl-CoA unbeeinflussbare Reaktion.

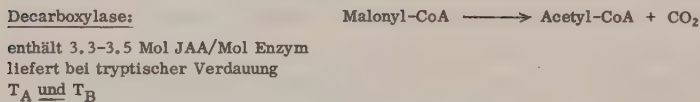
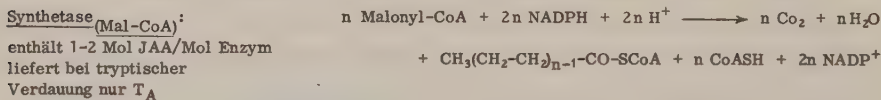
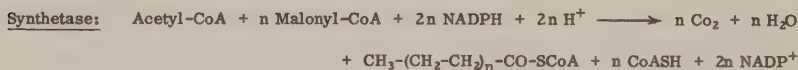
In einem präparativen Ansatz mit C¹⁴-Jodacetamid spalteten wir das Produkt dieser schnellen Reaktion mit Trypsin und fanden im Elutionsdiagramm der G₅₀-Chromatographie ausschließlich das T_A-Peptid.

Schematisch lassen sich die geschilderten Ergebnisse wie in Tabelle 11 zusammenfassen:

Tabelle 11 Veränderung der Synthetase durch Reaktion mit JAA



Katalysierte Reaktion:



Daß das in der Tabelle 11 mit Synthetase (Mal-CoA) angegebene Enzym tatsächlich eine eigene Molekelspezies und nicht ein Gemisch aus Synthetase und Decarboxylase darstellt, ist eine experimentell schwer zu entscheidende Frage. Der Geschwindigkeitsunterschied der beiden JAA-Reaktionen beträgt zwar den Faktor 20, im verwendeten Meßsystem (aufsteigender Ast in Abb. 62) würde die entstehende Decarboxylase-Aktivität jedoch durch den Überschuß intakter Synthetase um den Faktor 7 verstärkt, da die im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt entstandene Acetyl-CoA Molekel mit 7 Malonyl-CoA schnell zu Palmityl-CoA umgesetzt wird. Der dann verbleibende Faktor von 3 ist zwar ein Indiz, aber noch kein Beweis für die Existenz der Molekelspezies Synthetase (Mal-CoA) .

Ein solcher ist dagegen der Zeitabhängigkeit der von Synthetase (Mal-CoA) katalysierten Reaktion zu entnehmen. Wenn es sich um ein Gemisch von Synthetase mit Decarboxylase handeln würde, müßte im Scheitelpunkt der Kurve in Abbildung 62 die Kinetik des Enzymtestes eine Induktionsperiode zeigen, wie alle gekoppelten Reaktionen, in denen das Hilfsenzym nicht in sehr großem Überschuß vorliegt (vgl. z.B. S. 76). Alle Enzymteste (= Meßpunkte in Abb. 62) zeigten jedoch linearen Zeitverlauf.

Ein weiteres starkes Argument ist der verschieden schnelle Einbau von C¹⁴-Jodacetamid.

Auf Seite 78 erwähnten wir als Widerspruch unserer Hypothese der Decarboxylierung von Malonyl-CoA durch ungehemmtes und JAA-gehemmtes Enzym die Tatsache, daß in Gegenwart von NADPH auch ohne Acetyl-CoA eine Fettsäuresynthese in der Größenordnung der Synthese mit Acetyl-CoA zu erwarten wäre, die nicht gefunden wird. Gibt man jedoch nachträglich Acetyl-CoA einer derartigen Reaktionsmischung zu, erfolgt Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bis zu 50 % des maximalen Wertes (48). Acetyl-CoA löst, bildlich gesprochen, eine "Bremse" der Fettsäuresynthese. Man kann nun, wie in Abbildung 63 gezeigt ist, durch Jodacetamid (nicht aber mit Acetamid oder Jodessigsäure) denselben Effekt erreichen.

Acetyl-CoA spielt demnach eine Doppelrolle als Aktivator und Substrat der Fettsäuresynthese. Jodacetamid besitzt dagegen die Fähigkeit außer der "peripheren" SH-Gruppe eine weitere Gruppe am Enzym zu alkylieren und damit ebenfalls Fettsäuresynthese aus Malonyl-CoA zu veranlassen.

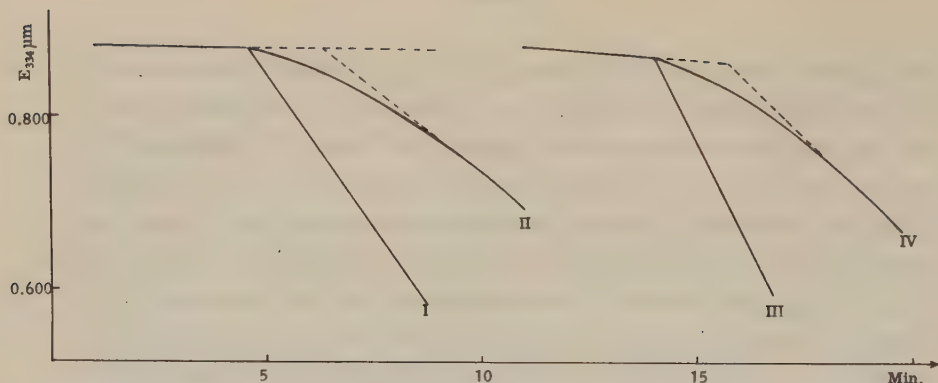


Abbildung 63 Auslösung der Fettsäuresynthese durch Zusatz von Acetyl-CoA oder JAA

Kurven I und III: Standardtest (spez. Aktivität: 890 bzw. 500 mE/mg); Start mit Malonyl-CoA ($1.7 \cdot 10^{-4}$ M);

Kurve II: Wie I, Start mit $0.55 \cdot 10^{-4}$ M Acetyl-CoA

Kurve IV: Testlösung enthält $1.7 \cdot 10^{-4}$ M Malonyl-CoA, kein Acetyl-CoA; Start mit $2 \cdot 10^{-4}$ M JAA.

Ein weiterer Versuch scheint diese Vorstellung zu bestätigen: Methylmalonyl-CoA, von dem bekannt war (23), daß es zur Kondensation wahrscheinlich nicht befähigt ist, wurde in dieser Eigenschaft noch einmal getestet. Im Falle einer Kondensationsreaktion müßte α -Methylacetoacetyl-enzym entstehen. Die Inkubation wurde, wie auf Seite 5 für Malonyl-CoA angegeben, durchgeführt. Die im 2.4-Dinitrophenylhydrazon des Methyl-Äthyl-Ketons gefundene Radioaktivität bedeutet eine spezifische Beladung des Proteins von 0.018, kann also vernachlässigt werden.

Tabelle 12 Umkristallisation des Methyläthylketon-2.4-Dinitrophenylhydrazons

Stufe	Schmelzpunkt	Impulse/min · mg
1. Kristallisation	106-111°C	206
2. "	106-111°C	100
3. "	108-114°C	112
4. "	114-115°C	96
5. "	114-115°C	102

In 2 ml 0.1 M KPO_4 pH 6.5 wurden bei 0°C 12.5 mg Synthetase (1000 mE/mg) mit 0.08 μ Mol C^{14} -Acetyl-CoA ($16.5 \cdot 10^6$ IpM/ μ Mol) und 0.48 μ Mol Methylmalonyl-CoA für 2 Min. inkubiert. Nach Denaturierung Zugabe von 100 μ Mol Methyläthylketon und Aufarbeitung wie für Acetoacetyl-Enzym auf S.125 beschrieben.

Die im Hydrazon nach fünfmaliger Umkristallisation gefundene Radioaktivität bedeutet eine spezifische Beladung von 0.018.

Mißt man aber die Decarboxylierung von 3 C^{14} -Methylmalonyl-CoA, indem man das entstehende $C^{14}O_2$ in Hymin absorbiert, findet man den in Abbildung 64 wiedergegebenen Zeitverlauf in Form einer Parabel.

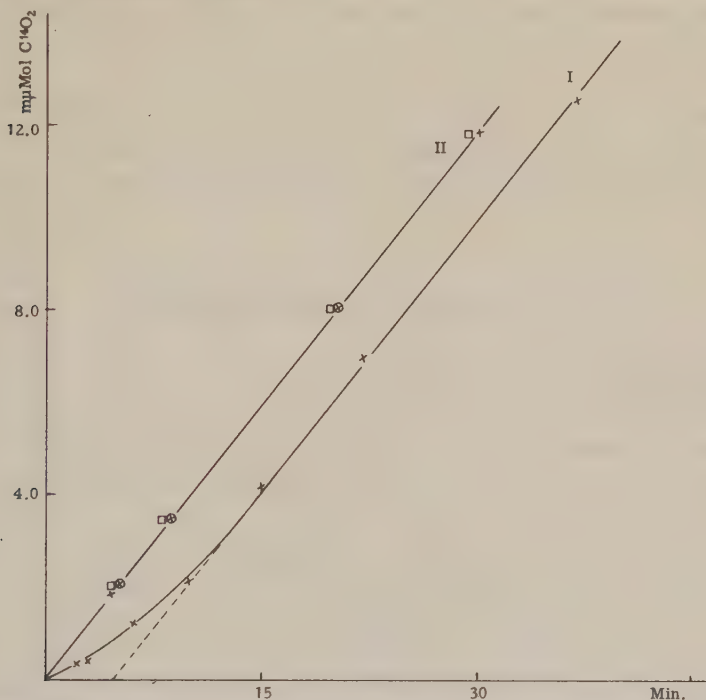


Abbildung 64 Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA durch Synthetase

I: nicht vorbehandeltes Enzym

M/10 KPO_4 pH 6.5; 1 mg/0.5 ml Enzym (1150 mE/mg); $6 \cdot 10^{-5} M$ 3- C^{14} -Methylmalonyl-CoA ($3.6 \cdot 10^6$ IpM/ μ Mol); V = 0.5 ml; T = 25°C; V_{max} (linearer Teil) 0.5 mE/mg. Zur Ausführung s. exp. Teil S.138 Methode I

II: vorbehandeltes Enzym

wie I, jedoch das Enzym vorbehandelt mit

- o a) $1 \cdot 10^{-4} M$ Methylmalonyl-CoA, 25 min, 0°C; 1 mg Enzym
- x b) $1 \cdot 10^{-4} M$ JAA, 15 min, 0°C; 1 mg Enzym
- o c) $1 \cdot 10^{-4} M$ Acetyl-CoA, 25 min, 0°C; 3 mg Enzym

Für c) wurde die dreifache Enzymmenge eingesetzt.

Das Absinken der Geschwindigkeit bei c) beruht auf der Konkurrenz von Acetyl-CoA und Methylmalonyl-CoA um die "zentrale" SH-Gruppe

Es wird ein Umsatz von 100 % erreicht, das Enzym decarboxyliert also D- wie L-Form des Methylmalonyl-CoA. Wir deuten diesen Befund, indem wir annehmen, daß durch die Unfähigkeit der Kondensation aus Methylmalonyl-CoA Propionyl-CoA entsteht, welches dann im Sinn der oben geschilderten Aktivierung die Decarboxylierungsfähigkeit

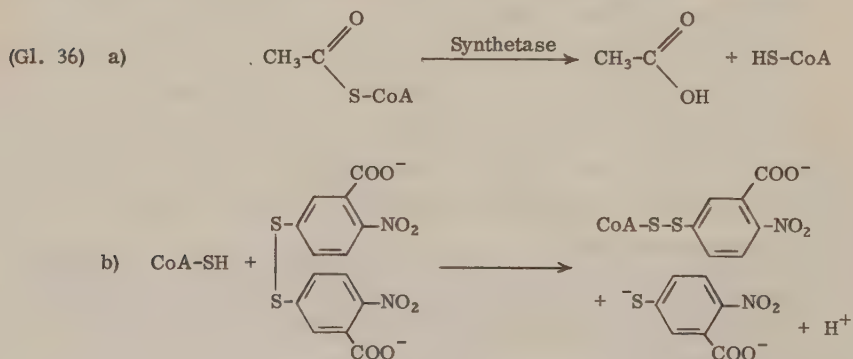
des Enzyms erhöht. Diese Behauptung läßt sich prüfen, indem das Enzym mit Methylmalonyl-CoA, JAA (1×10^{-4} M, 20 min, 0°C) oder Acetyl-CoA vorinkubiert wird. Wir fanden in allen drei Fällen vollständige Begradigung der Decarboxylierungskinetik (Abb. 64, II).

Erst weitere Versuche werden die Existenz einer Aktivatorstelle an der Synthetase beweisen oder widerlegen. Regulatorisch erschiene es sinnvoll, daß bei hoher Acetyl-CoA-Konzentration die Fettsäuresynthese aktiviert, bei kleiner dagegen deaktiviert wird.

V. VERSUCHE ZUM GESAMTKOMPLEX

1. Die Deacylaseaktivität der Synthetase

Auf Seite 16 erwähnten wir als eine katalytische Nebenreaktion der Acetoacetyl-Enzymbildung die Deacylierung von Acetyl-CoA durch Synthetase nach der Gleichung



die SCHWEIZER an der Spontanhydrolyse von C^{14} -Acetyl-Enzym entdeckt hatte (17).

Insbesondere für die Acetyl-Synthetase-Spaltansätze, wo Gramm-Mengen Enzym eingesetzt werden, mußte diese Aktivität berücksichtigt werden, wenn sie auch nur etwa 1/1000 der Geschwindigkeit der Fettsäuresynthese erreicht.

Zum Nachweis der Deacylaseaktivität bedienten wir uns der Farbreaktion von Thiolen mit Ellmann's Reagenz (5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure), die zu einem tiefgefärbten Thiophenolation führt, dessen Maximum der Farbintensität bei 413 mμ liegt (Gl. 36b).

In den ersten Versuchen stellte sich heraus, daß ein kontinuierlicher Test angewendet werden konnte, da die Deacylierungsaktivität von der Anwesenheit von Ellmann's Reagenz unbeeinflusst blieb. Jedoch hemmt das Reagenz die Fettsäuren synthetisierende Aktivität der Synthetase vollständig, wie die Zeitabhängigkeit in Abbildung 65 zeigt.

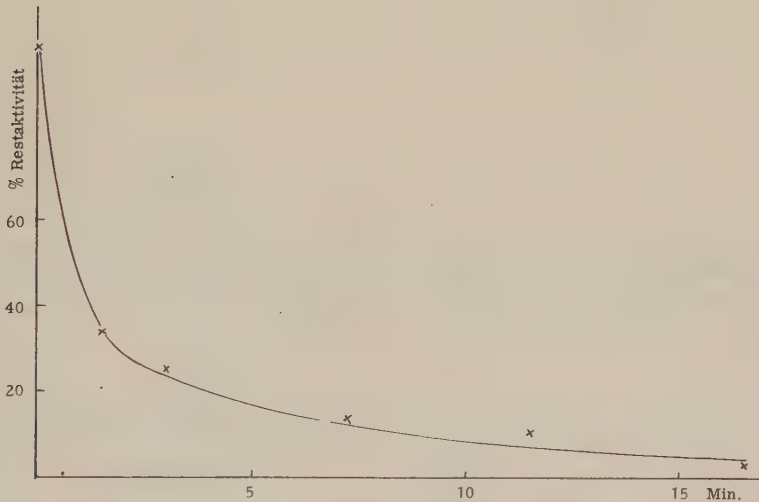


Abbildung 65 Hemmung der Synthetase durch 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure (Ellmanns Reagenz)

M/10 KPO_4 pH 6.5; 10^{-3} M Ellmanns Reagenz; 4.3 mg/ml Enzym (1250 mE/mg), SH-frei; V = 0.2 ml; T = 25°C; zu den Zeiten der Abszisse wurde mit Aliquoten der Standardtest ausgeführt (exp. Teil S.121); Ordinate: Anfangsgeschwindigkeiten

Die Hemmung ist reversibel, so wird z.B. ein Enzym mit 6 % Restaktivität durch 0.1 M Cystein in 40 Minuten zu 90 % der maximalen Aktivität reaktiviert. Abbildungen 66-68 charakterisieren die deacylierende Aktivität der Synthetase für das Substrat Acetyl-CoA. Die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion (Gl. 36a) beträgt 1.0-1.5 mE/mg (1 E = 1 μMol Acetyl-CoA deacyliert pro mg Enzym und Minute bei 25°C). Die Michaeliskonstante, ermittelt aus Abbildung 68, ergibt einen Wert von

$$K_M = 1.8 \cdot 10^{-5} \text{ (Mol/ltr)}$$

für das Substrat Acetyl-CoA.

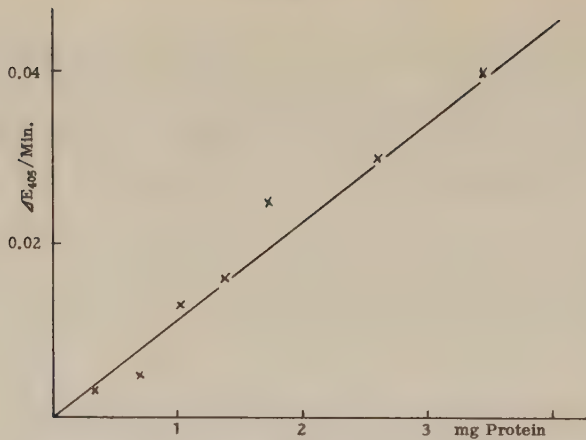


Abbildung 66 Enzymabhängigkeit für den Deacylasetest

Jeder Meßpunkt: $M/10 \text{ KPO}_4$ pH 6,5; 10^{-3} M DTNB 0,21 $\mu\text{Mol Acetyl-CoA}$; Start mit Enzym entsprechend Abszisse (1250 mE/mg); $V = 2,0 \text{ ml}$; $T = 25^\circ\text{C}$; $\lambda = 405 \text{ m}\mu$; $d = 1 \text{ cm}$; Versuchsausführung siehe expt. Teil S. 141

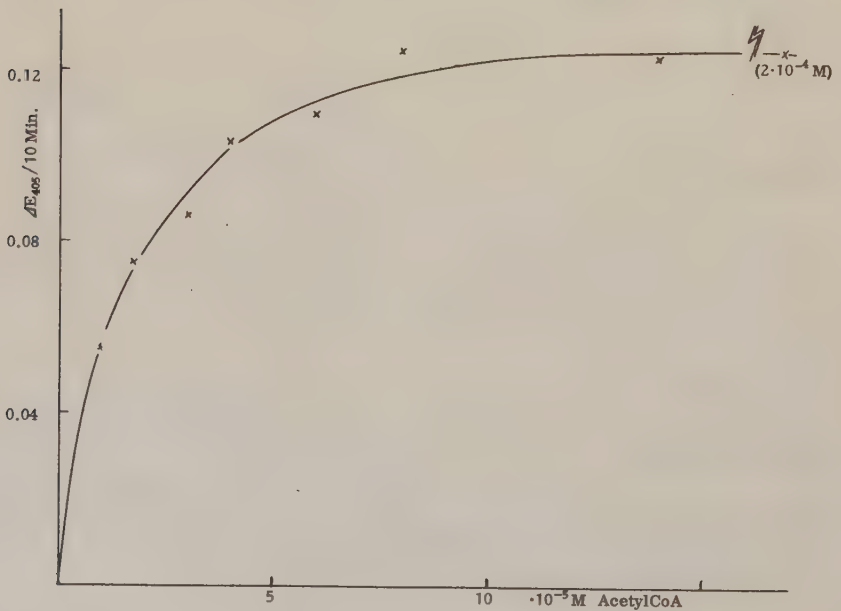


Abbildung 67 Substratabhängigkeit des Deacylasetestes

Wie Abb. 66, 2 mg Enzym (1250 mE/mg); Acetyl-CoA entsprechend Abszisse. Versuchsausführung siehe expt. Teil S. 141

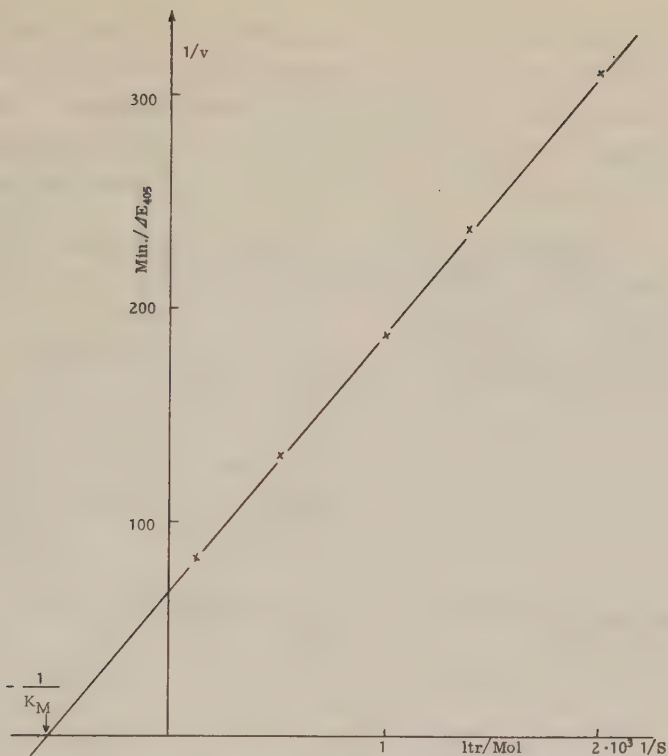


Abbildung 68 Lineweaver-Burk Diagramm zur Ermittlung der Michaeliskonstanten von Acetyl-CoA im Deacylasetest (Meßwerte aus Abb. 67)

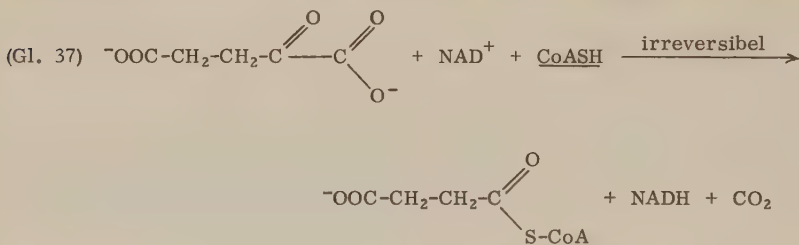
Dieser Wert deckt sich gut mit der Michaeliskonstanten von Acetyl-CoA für die Fettsäuresynthese.

Für die Deacylasewirkung sind zudem keine Thiolgruppen des Enzyms notwendig. JAA- oder NÄM-gehemmtes Enzym deacyliert Acetyl-CoA mit unverminderter Geschwindigkeit, so daß wir zur Deutung dieser Aktivität eine Nebenreaktion der Transferasen annehmen. Ein auf die X- oder Y-Gruppe dieser Teilenzyme übertragener Acyl-Rest hydrolysiert mit geringer Geschwindigkeit zur freien Säure unter Regenerierung des Enzyms.

Interessanterweise liegt die Deacylasewirkung der Synthetase für Methylmalonyl-CoA unter $5 \cdot 10^{-2} \text{ mE/mg}$, beträgt also nur etwa $1/30$ der Aktivität für Acetyl-CoA. Es weist also die Malonyltransferase (X-Gruppe, vgl. Abb. 37) eine wesentlich kleinere Deacylaseaktivität auf als die n-Acyl-Transferase (Y-Gruppe, vgl. Abb. 37).

LYNEN (15), der als Hauptprodukt der Fettsäuresynthese durch das Hefeenzym die Coenzym-A-Ester der Fettsäuren fand, daneben aber etwa 20 % freie Säuren, führt das Entstehen der letzteren auf eine Deacylaseaktivität zurück; die Größe der oben beschriebenen Deacylaseaktivität reicht aus, um diesen experimentellen Befund zu erklären. Daß Primärprodukt die Coenzym A-Ester sind, d.h. die Abschlußreaktion aus Abbildung 2 streng Coenzym A-abhängig ist, kann man in einem einfachen Test bestätigen.

Man gibt einer Testmischung für die Fettsäuresynthese die Substrate der α -Ketoglutaratdehydrogenase (α -KGDH)-Reaktion mit Ausnahme von Coenzym A zu (Gl. 37).



In Abwesenheit von α -KGDH findet normale Fettsäuresynthese statt, wie aus Abbildung 69 ersichtlich.

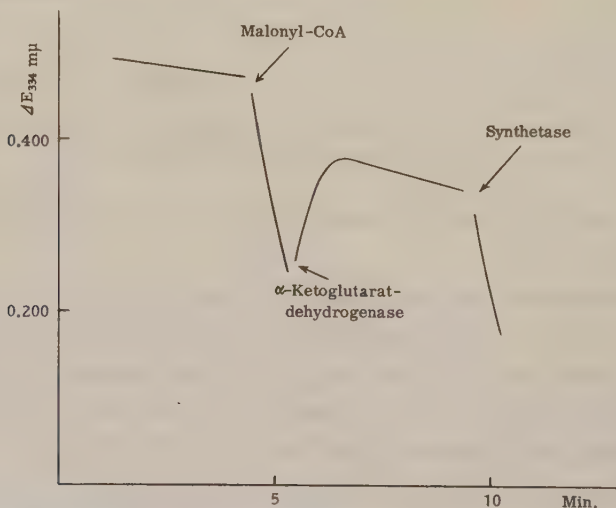


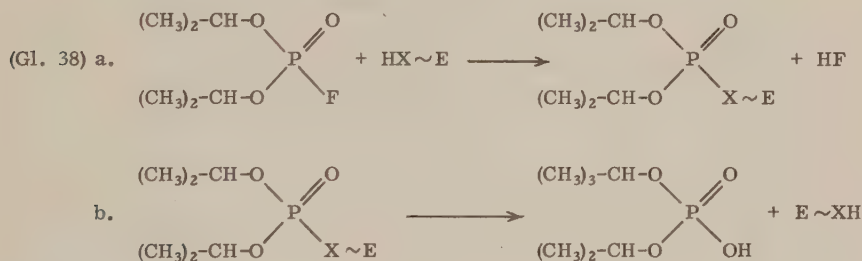
Abbildung 69 Abbruch der Fettsäuresynthese durch Abfangen von freiem Coenzym A

Das Volumen von 2.0 ml enthält: 200 μ Mol KPO_4 pH 6.5; 0.75 mg Serumalbumin; 0.30 μ Mol NADPH; 3 μ Mol NAD^+ ; 12 μ Mol α -Ketoglutarat; 0.15 μ Mol Acetyl-CoA; 30 mE Synthetase; d = 1 cm; λ = 334 mμ; T = 25°C; Start mit 0.2 μ Mol Mal-CoA; Pfeil: Zugabe von 100 mE α -Ketoglutaratdehydrogenase bzw. 150 mE Synthetase.

Gibt man nun aber α -KGDH im Überschuß zu (erster Pfeil in Abb. 69), so läuft Reaktion 37 schneller ab als die Fettsäuresynthese, verbraucht das erzeugte Coenzym A (dabei wird NADH erzeugt, die Extinktion in Abb. 69 steigt an) und hemmt damit die Fettsäuresynthese. Erst erneute Zugabe von Synthetase im Überschuß gegenüber α -KGDH bringt sie erneut in Gang.

2. Die Inhibierung der Synthetase durch Diisopropyl-fluorophosphat

Die Befunde SCHWEIZERs über die Malonyl-X-Peptide (vgl. S. 37) hatten ergeben, daß an der kovalenten Bindung zwischen Acetyl-Rest und Enzym vermutlich die Hydroxylgruppe eines Serin-Restes beteiligt ist. Nun nimmt an der Bildung des aktiven Zentrums von Esterasen in der Regel Serin teil, die enzymatische Aktivität dieser Enzyme wird durch Diisopropyl-fluorophosphat (DFP) und verwandte Verbindungen zerstört, und als Produkt der Phosphorylierung wurde in vielen Fällen ein Phosphoserinderivat nachgewiesen (Gl. 38a).



Es lag deshalb nahe, DFP in seiner Wirkung auf Synthetase zu untersuchen. Abbildung 70 zeigt, daß die Fettsäuresynthetaseaktivität durch DFP vollständig gehemmt werden kann, wenn die Hemmstoffkonzentration genügend hoch ist.

Kurve I in Abbildung 70 deutet an, daß es sich möglicherweise um eine reversible Hemmung handelt. Auf ihrem Plateau wäre dann kinetisches Gleichgewicht zwischen Reaktion mit dem Enzym (38a) und Hydrolyse des phosphorylierten Enzyms (38b) eingetreten.

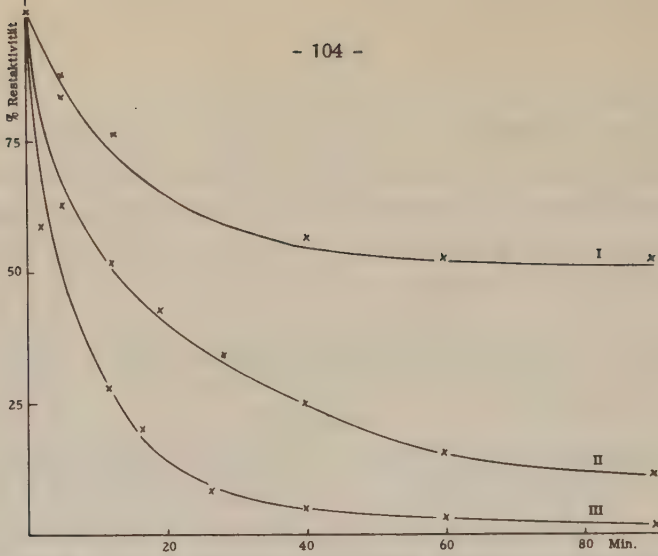


Abbildung 70 Hemmung der Synthetaseaktivität durch Diisopropyl-fluorophosphat
 I: $1 \cdot 10^{-3}$ M DFP; II: $4 \cdot 10^{-3}$ M DFP; III: $7 \cdot 10^{-3}$ M DFP
 Zur Versuchsausführung siehe expt. Teil S. 142

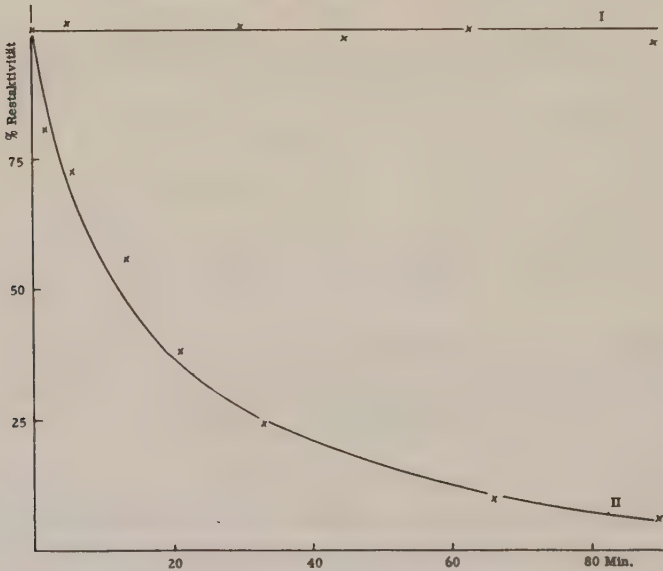


Abbildung 71 Schutzversuch vor DFP-Hemmung der Synthetase mit Acetyl-CoA
 I : mit $4 \cdot 10^{-3}$ M Acetyl-CoA vorinkubierte Synthetase
 II: Kontrollkurve ohne Acetyl-CoA
 DFP-Konzentration in I und II: $4 \cdot 10^{-3}$ M.
 Enzymkonzentration 2,4 mg/ml (1000 mE/mg)
 Versuchsausführung siehe expt. Teil S. 142

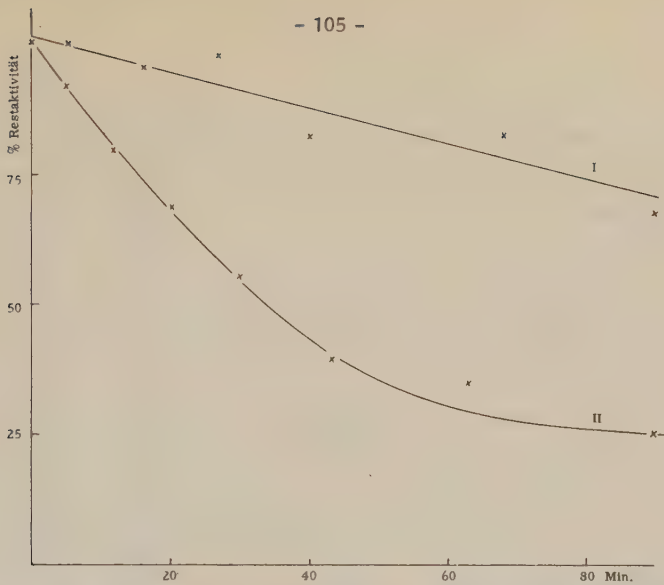


Abbildung 72 Schutzversuch vor DFP-Hemmung der Synthetase mit Methylmalonyl-CoA

I: mit $2 \cdot 10^{-3}$ M Methylmalonyl-CoA vorinkubierte Synthetase

II: Kontrollkurve ohne Methylmalonyl-CoA

DFP-Konzentration in I und II: $2 \cdot 10^{-3}$ M, Enzymkonzentration 2,4 mg/ml (1000mE/mg) Versuchsauführung siehe expt. Teil S. 142

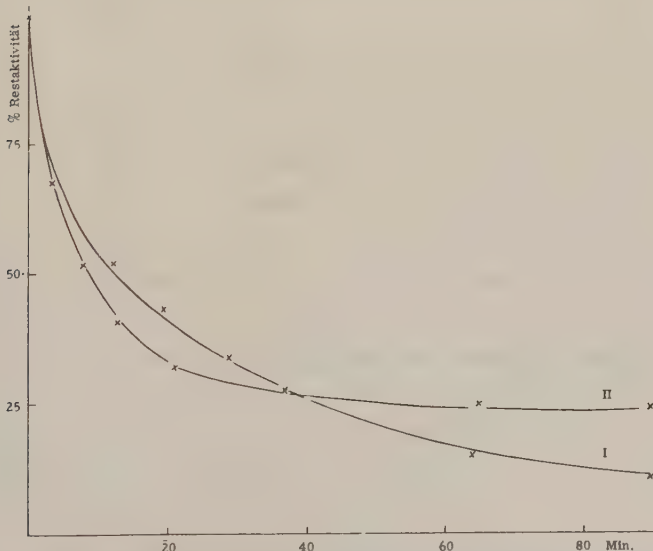


Abbildung 73 Schutzversuch vor DFP-Hemmung der Synthetase mit Malonyl-CoA

Versuchsansatz und Versuchsauführung identisch wie in Abb. 71

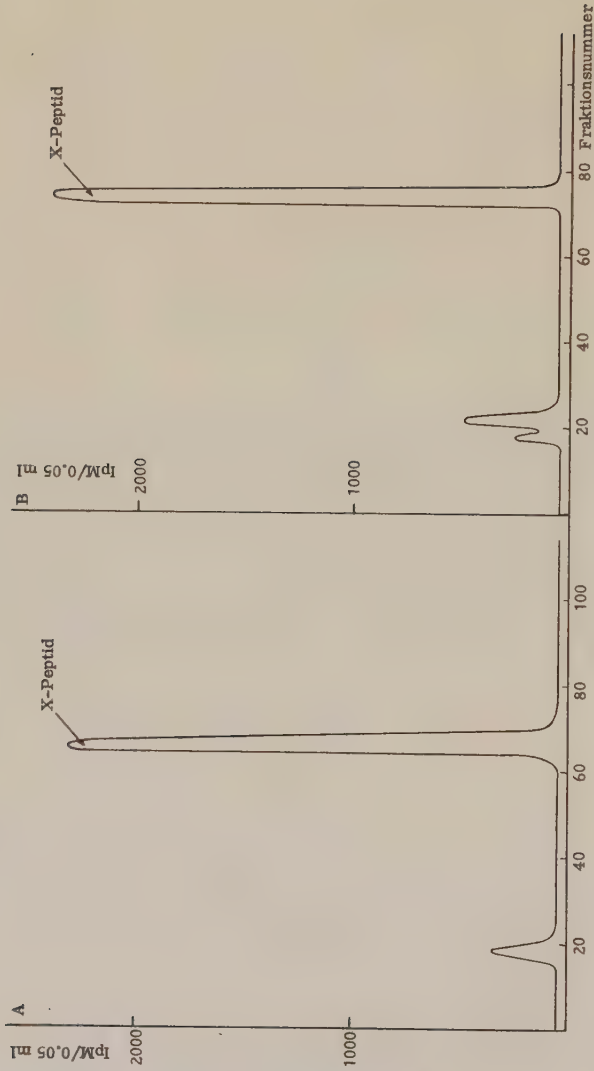


Abbildung 74 DEAE-Sephadex-Chromatographie eines Pepsinhydrolysates von Methylmalonyl-Enzym entstanden aus:

- A: ungehemmtem Enzym
- B: DFP-gehemmtem Enzym

Zur Versuchsausführung siehe expt. Teil S.142. Identifizierung der Gipfel nach SCHWEIZER (in 25)

Unsere Erwartung, mit dieser Hemmung die Malonyl-Transferase inhibiert zu haben, wurde enttäuscht. Die Abbildungen 71-73 zeigen Schutzversuche mit Acetyl-, Methylmalonyl- und Malonyl-Coenzym A. Während die Schutzwirkung des Acetyl-Restes vollständig ist und die des Methylmalonyl-Restes deutlich zu erkennen, scheint der Malonyl-Rest die Inhibierung eher zu beschleunigen als zu verlangsamen.

Daß der Serin-Rest der Malonyl-Transferase (X-Gruppe) vermutlich nicht der Reaktionspartner des DFP in der Inhibierungsreaktion ist, konnte in folgendem Versuch gezeigt werden:

DFP-gehemmtes Enzym und natives Enzym wurden mit C^{14} -Methylmalonyl-Coenzym A inkubiert, das denaturierte Acylprotein mit Pepsin verdaut und das Hydrolysat nach SCHWEIZER (in 25) an einer DEAE-Sephadex-Säule chromatographiert. Abbildung 74 zeigt die unveränderte Beladung der X-Gruppe mit Acyl-Resten.

Da die Malonyl-Transferase als Reaktionsort des DFP am Multienzymkomplex unterschied, verfolgten wir dieses Thema nicht weiter. Thioesteranalysen für Acetyl-, Malonyl- und Methylmalonyl-Enzym nach DFP-Einwirkung sprechen für eine verminderte Beladung der "zentralen" SH-Gruppe, doch ist dann die mangelnde Schutzwirkung des Malonyl-Restes vor dem Hemmstoff nicht recht verständlich.

3. Zur Struktur des Komplexes

LYNENs Postulat (23) der "zentralen" SH-Gruppe als dem Mittelpunkt nicht nur der enzymatischen Funktion sondern auch der räumlichen Struktur des Synthetase-Komplexes wurde durch die Entdeckung von 4'-Phosphopantethein als ihrem Träger eindrucksvoll bestätigt (26). Wie auch der Liponsäure-Rest in der α -Ketoglutaratdehydrogenase (83), bildet das 4'-Phosphopantethein eine Art molekularen Armes von etwa 20 Å Länge. Dadurch wird der notwendige räumliche Kontakt der Zwischenprodukte, die am Ende dieses Armes gebunden sind, mit den ihre weitere Umsetzung katalysierenden Enzymen wesentlich erleichtert. Aufgrund der elektronen-optischen Aufnahmen machte HAGEN (16) einen ersten Strukturvorschlag in Form dreier ineinandergfügter Ringe. Dieses Bild erwies sich jedoch, wie auch der Vorschlag dreier an ihrer Basis verbundener Flügel, als nicht befriedigend, da sich herausstellte, daß die "Brücke" in der Mitte der Partikel nicht höher lag als die Außenseiten der Teilchen (49).

Eine dritte Möglichkeit der Erklärung des elektronen-optischen Bildes ist die Vorstellung der Rotation um die längere Achse des Partikels. Man findet dann ein Tonnen-ähnliches Rotationsellipsoid, mit einer Art Trennwand in der Mitte, wie es Abbildung 75 schematisch andeutet.

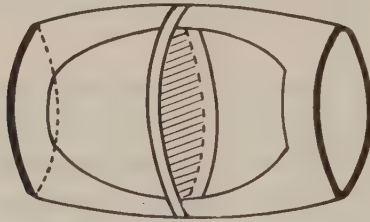


Abbildung 75 Räumliches Modell des Synthetasemoleküls (schematisch)

Erste physikalische Messungen mit der Röntgenkleinwinkelstreu-Methode bestätigen diese Vorstellung (50). Schätzt man aufgrund der Dimensionen im elektronen-optischen Bild und des partialspezifischen Volumens die Raumerfüllung durch das Protein ab, so ergibt sich ein erhebliches Defizit gegenüber einem kompakten Proteinkörper, d. h. man muß dem Synthetasemolekül einen gewissen Hohlraumcharakter zusprechen.

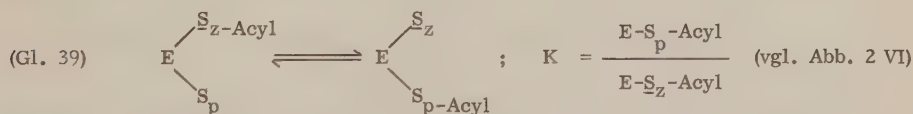
Mit dieser Vorstellung ist man gezwungen, den morphologisch dimeren Charakter der Synthetase zu behaupten. Die "Trennwand" wäre die gemeinsame Basis der Trägerproteine für die 4'-Phosphopantethein-Reste, die von den anderen Teilenzymen halbkugelförmig umgeben wären.

Einen Anhaltspunkt, daß das reduzierende Flavinenzym zweimal im Synthetasemolekül enthalten ist, gibt der Gehalt von 4 Mol FMN/Mol Synthetase (23).*) Wir fanden ihn als Mittelwert von 7 Messungen an insgesamt 12 g Protein bestätigt. Ebenso muß das kondensierende Enzym zweimal im Komplex enthalten sein, falls sich die in Kapitel IV geschilderten Ergebnisse bewahrheiten.

*) Alle bisher bekannten Flavinmononucleotid-Enzyme enthalten 2 FMN pro katalytisches Zentrum.

Eine experimentelle Erklärung des Syntheseabbruches auf der Stufe von C_{16} - C_{18} der Fettsäureketten ist bisher nicht gefunden worden (17). LYNEN (25) äußerte die Vermutung, daß durch eine hydrophobe Umgebung der "zentralen" SH-Gruppe, bei wachsender Länge des Fettsäure-Restes der Acyl-Rest durch stärker werdene Wechselwirkung, seine Verteilung zwischen "zentraler" und "peripherer" SH-Gruppe zugunsten der ersteren verändere. Es lag also nahe, die Synthetase auf einen eventuellen Lipidgehalt hin zu prüfen. Abbildung 76 zeigt das Gaschromatogramm von Fettsäuremethylestern, die durch Methylierung eines verseiften (B) bzw. unverseiften (A) Butanol-Extraktes aus Synthetase entstanden sind. Neben geringen Mengen freier Fettsäuren *), die zum Teil nicht identifiziert sind, tritt in A ein großer Massengipfel einer unbekannten Verbindung auf, dessen Retentionszeit im Bereich einer gesättigten C_{23} -Fettsäure liegt. Abgeschätzt macht seine Masse etwa 0.5-1% der Enzympartikel aus. Nach Verseifung wird dieser Gipfel nicht mehr gefunden, das erhöhte Auftreten von Fettsäuren kompensiert nicht quantitativ seine Masse.

Erst weitere Versuche werden zeigen, ob die Synthetase einen Lipidanteil als Strukturelement besitzt, der dann die von LYNEN vermutete Funktion einnehmen könnte. Daß die Hypothese sehr wohl geeignet ist, den Kettenabbruch zu erklären, zeigt folgende Rechnung:



Die Hypothese enthält die Annahme, daß proportional den Acyl-Resten, die im Gleichgewicht die "periphere" SH-Gruppe besetzen, durch Kondensation Kettenverlängerung eintritt und proportional den Acyl-Resten auf der "zentralen" SH-Gruppe eine Übertragung auf Coenzym A stattfindet (vgl. Abb. 2). NEMETHY und SCHERAGA (84) haben als Inkrement für hydrophobe Wechselwirkungen pro C_2 -Einheit **) ein ΔF von -1.6 kcal berechnet. Eine C_{n+2} -Alkankette würde also von einer hydrophoben Umgebung um diesen Betrag stärker gebunden als eine C_n -Kette. Dies bedeutet ein logarithmisches Anwachsen der Gleichgewichtskonstante von Gleichung 39. Abbildung 77 zeigt eine auf dieser Annahme berechnete Verteilungskurve der Produkte.

*) Möglicherweise werden auch geringe Mengen freier Fettsäuren während der Anreicherung aus den Hefezellen vom Enzymprotein mitgeschleppt.

**) -0.8 kcal für den Übergang einer CH_2 -Gruppe aus Wasser in ein unpolares Lösungsmittel

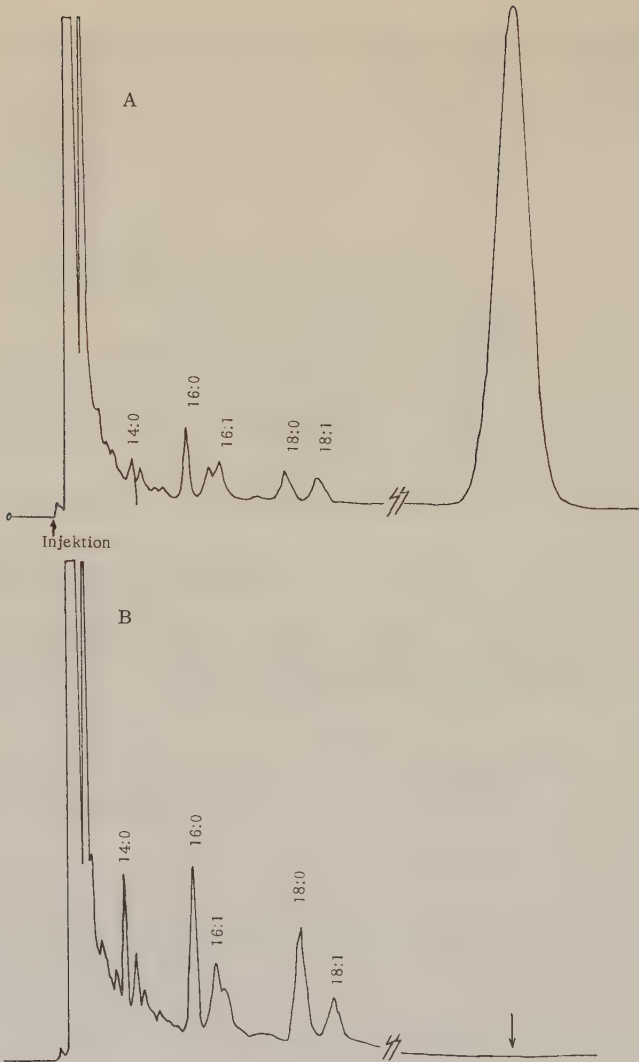


Abbildung 76 Gaschromatographie eines methylierten Butanolextraktes aus Synthetase

A: Methylierung des unverseiften Extraktes

B: Methylierung des verseiften Extraktes

Identifizierte Fettsäuremethylester sind im Diagramm bezeichnet

(Myristinsäuremethylester = $C_{14:0}$; Ölsäuremethylester = $C_{18:1}$ u.s.w.)

3 μ ltr Essigesterlösung; Empfindlichkeit 100×2

Zur Versuchsausführung siehe expt. Teil S. 142

Für die Ausführung der gaschromatographischen Analyse danken wir Dr. R. Seyffert, MPI für Zellchemie

C-Atome	12	14	16	18	20	22
K (Gl. 39)	360	19	1	$5.3 \cdot 10^{-2}$	$2.8 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-4}$
% im Produkt	0.3	5.0	47.5	45.2	2.0	0

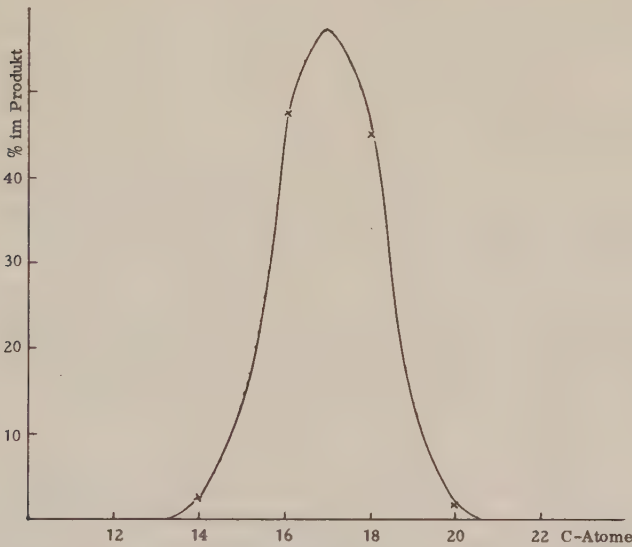


Abbildung 77 Berechnete Produktverteilung der Fettsäuresynthese

Man erkennt, daß neben den Hauptprodukten Palmityl-CoA und Stearyl-CoA die C_{14} - und C_{20} -Säuren nur in geringem Prozentsatz auftreten, was sich mit dem experimentellen Bild deckt.

VI. EXPERIMENTELLER TEIL

Vorbemerkung

Alle Inkubationen mit Enzym wurden, wenn nicht anders vermerkt, in 0.1m Kalium-phosphatpuffer ($\mu = 0.187$) bei 0°C durchgeführt. Die Enzymmenge (bis zu 40 mg) wurde vor dem Einsetzen in die Versuche der Stammlösung entnommen (siehe S.119), 1:4 mit Puffer verdünnt und über eine Sephadex-G₂₅-Säule filtriert (1.5 · 30 cm), die mit 0.1m KPO₄ pH 6.5 äquilibriert ist. Größere Mengen wurden dialysiert (m/100 KPO₄ pH 6.5) und durch Pufferzugabe die Molarität auf 0.1 erhöht.

Folgende Lösungen wurden nicht länger als einige Stunden benützt: Neutrale Cysteinlösung, hergestellt durch Mischen von 2 Teilen 2m Cysteinlösung, eines Teiles 4n KOH und eines Teiles 1m KPO₄ pH 6.5;

wäßrige Lösungen von N-Äthylmaleinimid und Jodacetamid; Perameisensäure.

Protein wurde durch Zugabe von 3m Trichloressigsäure bis zur Endkonzentration 0.3m denaturiert (im theoretischen Teil als TCE-denaturiertes Enzym bezeichnet).

A) Allgemeine Methoden

1. Verwendete Apparate und käufliche Präparate

Photometer Eppendorf, Netheler und Hinz, mit Philipps-Kompensograph PR 2210 A/00

Spektralphotometer Zeiss Modell M4QII

Spektralphotometer Carry Modell 14

Servall Automatic Superspeed Centrifuge RC-2

Präparative Ultrazentrifuge Beckman-Spinco L 50

Christ Tischzentrifuge Superspeed Junior 1

Analytische Ultrazentrifuge Beckmann-Spinco, Modell E

Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 314 E und Modell 314-DC

Frieseke-Hoepfner Methan Durchflußzähler FH 51

Frieseke-Hoepfner Radiopapierchromatograph FH 452 mit Linienschreiber

Pherograph "Original Frankfurt" der Fa. Hormuth und Vetter

Hochspannungspapierelektrophorese nach Michl

Trägerfreie Hochspannungselektrophorese der Fa. Bender und Hobein, München

Fraktionskollektor Fractomat Y 3

pH-Meter der Fa. Püsl München, Type 11/12

Aminosäureanalysator Beckmann-Spinco Modell 120 B

Zellhomogenisator nach Merckenschlager und Schlossmann

Kofler-Heizmikroskop der Fa. C. Reichert, AG, Wien

Gaschromatograph Aerograph 1520 Wilkens mit Verbrennungsofen Packard Tri-Carb Combustion Furnace (Wärmeleitfähigkeitdetektor)

Rotavapor 'R' der Fa. Büchi

Alle Co-Enzyme und Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Boehringer (Mannheim) bezogen; Serumalbumin vom Rind (Behring-Werke, Marburg); Jodacetamid und N-Äthylmalein-imid (Th. Schuchardt, München); p-Chloromercuribenzoat und 5,5'-Dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure (C. Roth, Karlsruhe); alle Sephadextypen (Pharmacia Uppsala); Dowex 50 · 2, Dowex 50 · 8, Dowex 2 · 8, Diisopropylfluorophosphat, Pepsin und Trypsin (Serva, Heidelberg); 1-C^{14} -Acetat, C^{14} -Jodacetamid und $\text{Ba C}^{14}\text{O}_3$ (Radiochemical Centre, Amersham); Hyamin (1m in Methanol, Packard Inc., Illinois).

2. Herstellung von Substraten

a) Acyl-CoA-Derivate:

Acetyl- und Propionyl-CoA wurden durch Umsetzung von Essigsäure- bzw. Propionsäureanhydrid in 80-90 % Ausbeute gewonnen (50), Malonyl-CoA nach EGGERER und LYNEN (53) und Methylmalonyl-CoA nach OVERATH (54) durch Umesterung aus den beiden S-Acyl-Cysteamin-Derivaten. Die Ausbeuten liegen bei 100 % bezogen auf Coenzym A.

1-C^{14} -Acetyl-Coenzym A

Es wurde nach WIELAND (55) analog der Vorschrift für C^{14} -Propionyl-CoA über das gemischte Anhydrid mit Chlorameisensäureäthylester dargestellt. Unter Verwendung absolut peroxydfreien Tetrahydrofurans und Ausschluß von Luftfeuchtigkeit beim Abblasen des Äthers wurden Ausbeuten von 30 % erzielt, jedoch nicht höher. Wo nicht eine besonders hohe spezifische Radioaktivität des Präparates notwendig war, wurde mit Acetanhydrid nachacyliert.

1-C^{14} -Malonyl-Coenzym A (56)

2.5 Einheiten Acetyl-CoA-Carboxylase ^{*)} wurden in 1 ml gepufferter Lösung, die 10 μMol

^{*)} Dankenswerterweise von Dr. S. NUMA, MPI für Zellchemie überlassen.

Citrat und 10 μMol Glutathion enthielt für 30 min bei Zimmertemperatur und pH 7.5 gehalten und dann zu einer Lösung gegeben, die in 25 ml Gesamtvolumen folgende Substanzmengen gelöst enthielt:

1000 μMol	KHCO_3
35 μMol	$\text{C}^{14}\text{-Acetyl-CoA}$
3 mMol	KPO_4 pH 7.5
80 μMol	MgCl_2
200 μMol	ATP
100 μMol	NADH
200 μMol	Phosphoenol-Pyruvat (PEP)
je 0.02 ml	Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase (Boehringer)

Die Lösung wurde 90 min bei 25°C inkubiert ^{*)}, dann durch Zugabe von Dowex 50 in H^+ -Form angesäuert, vom Dowex abzentrifugiert, dieser 2mal mit Wasser gewaschen und die vereinigten Überstände nach Einengen auf 3 ml auf einer Dowex-2-Säule der Chromatographie unterworfen (generell für alle Acyl-CoA-Derivate: 17). Wenn ausnahmsweise das $\text{C}^{14}\text{-Acetyl-CoA}$ bei der ersten Chromatographie nicht abgetrennt werden konnte, wurde es einer enzymatischen Umwandlung zu Citrat unterworfen und das Gemisch auf der Dowex 2-Säule rechromatographiert. Die Ausbeute beträgt durchschnittlich 40 %.

3- C^{14} -Malonyl-Coenzym A (59, 60)

Die Vorschrift folgt der für 1- C^{14} -Malonyl-CoA, jedoch wird das Volumen möglichst klein gehalten (3-4 ml), das Reaktionsgefäß mit Stickstoff gespült und statt $\text{C}^{14}\text{-Acetyl-CoA}$ $\text{KHC}^{14}\text{O}_3$ eingesetzt. Der Fortgang der Reaktion kann hier einfach an der Zunahme der säurestabilen Radioaktivität verfolgt werden, indem man Aliquote mit einem Tropfen Essigsäure eindampft und nach dem Trocknen unter Scintillationslösung mißt.

Für die Darstellung von 3- C^{14} -Malonyl-CoA kann auch die durch Synthetase katalysierte Austauschreaktion von C^{14}O_2 mit Malonyl-CoA benützt werden:

Im Volumen 2 ml sind in einem geschlossenen Gefäß enthalten:

^{*)} Das Fortschreiten der Reaktion wird durch enzymatischen Test des gebildeten Malonyl-CoA kontrolliert.

15	µMol	Malonyl-CoA
41.6	µMol	C ¹⁴ O ₂
3	µMol	Capryl-CoA (nach (17) hergestellt)
200	µMol	KPO ₄ pH 7.5
10	mg	Synthetase

Inkubationszeit 100 min bei 25°C; Stop mit TCE in einem Warburggefäß. Die Ausbeute beträgt 60 % (bezogen auf Malonyl-CoA). Die Aufarbeitung erfolgt wie für 1-C¹⁴-Mal-CoA beschrieben.

3-C¹⁴-Methylmalonyl-Coenzym A (54,58)

Ein repräsentativer Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 5.50 ml

750	µMol	Trispuffer pH 8.0
20	µMol	Propionyl-CoA
17.3	µMol	KHC ¹⁴ O ₃
50	µMol	Mg Cl ₂
30	µMol	ATP
50	µMol	PEP
5	µMol	GSH
30	µMol	NADH
0.01	ml	Pyruvatkinase (Boehringer)
0.01	ml	Lactatdehydrogenase (Boehringer)

Start mit 2 Einheiten Propionyl-CoA-Carboxylaselösung *). Inkubation bei 37°C.

Nach 30 Minuten wird durch Eintauchen des Reaktionsgefäßes für eine Minute in ein Wasserbad von 100°C die enzymatische Reaktion abgebrochen und dann die Reaktionsmischung auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von 200 µMol Glukose und 0.01 ml einer Lösung von kristalliner Hexokinase (Boehringer) wird erneut für 15 Minuten bei 20°C inkubiert, mit TCE (0.3m Endkonzentration) das Protein in einem Warburggefäß denaturiert, abzentrifugiert, der Überstand 4mal mit 3 ml Äther extrahiert und mit KOH auf pH 6 gebracht. Dann wird wie üblich die Dowex-Chromatographie ausgeführt.

*) wurde von Herrn Dr. J. Retey erhalten.

b) Sonstige Präparate

Kalium-C¹⁴-Bicarbonat

In einem Warburggefäß werden 8.2 mg BaC¹⁴O₃ in 0.5 ml CO₂-freiem Wasser suspendiert. Der Einsatz enthält 0.2 ml 0.5n KOH, der Kipper 0.4 ml 35 % Perchlorsäure. Nach N₂-Spülen wird das Gefäß geschlossen, bei 0°C gekippt und über Nacht stehen gelassen (nach 30 Minuten Eisbad bei Raumtemperatur).

S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin (61, 62)

20 mMol N-Acetylcysteamin, hergestellt nach KUHN (57), werden in 10 ml Wasser gelöst und pH 7.5 eingestellt. Unter Rühren werden bei Z.T. 2 ml frisch destillierten Diketens (26 mMol) zugetropft. Nach 20 Minuten wird die Lösung mit HCl auf pH 2 gebracht und am Rotationsverdampfer auf 5-6 ml konzentriert, danach mit Natriumchlorid gesättigt und dreimal mit je rund 30 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über Nacht mit Natriumsulfat (frisch gegläht) getrocknet und das nach Abziehen des Lösungsmittels zurückbleibende Öl aus Äther/Essigester kristallisiert. Proben der mehrmals umkristallisierten Substanz (Fp. 53-55°C) wurden auf der Mikrowaage eingewogen und ihr Gehalt spektrophotometrisch bei der Wellenlänge 235 mμ bestimmt ($\epsilon = 4150 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$). Er betrug 95-98 % des theoretischen Wertes.

Darstellung von β -Hydroxybuttersäuremethylester

26.15 g eines gemischten Zn, Ca-Salzes der β -Hydroxybuttersäure, entsprechend 200 mMol freier Säure wurden mit der äquivalenten Menge Schwefelsäure angesäuert und das Produkt durch 6stündige Perforation in ätherische Lösung gebracht. Nach Trocknen mit CaCl₂ wurde diese tropfenweise mit einer frisch aus Nitrosomethylharnstoff bereiteten Lösung von Diazomethan in Äther unter Rühren versetzt, bis eine schwach gelbliche Tönung bestehen blieb und keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Nach Abziehen des Äthers wurde der leicht gelbliche Rückstand im Wasserstrahlpumpen-Vakuum destilliert. Die Hauptfraktion geht bei 63°C (10 mm Hg, 75-78° Badtemperatur) über.

Ausbeute: 7 g entsprechend 58 mMol (29%). Die Substanz war gaschromatographisch rein.

Darstellung von Dansyl-Aminosäuren (63)

Je 250 μ Mol der Aminosäure wurden in 10 ml 0,1m KHCO_3 -Lösung gelöst und 400 μ Mol Dimethylamino-Naphthalin-Sulfonsäure-Chlorid (Dansyl-Cl) in 10 ml Aceton zugegeben. Nach 2 bis 3 Stunden wurde der Inhalt mit Essigsäure neutralisiert, zur Trockne gebracht und in 5 ml 0,01m Essigsäure (30 % an Aceton) gelöst. Die Lösung wurde auf eine Dowex 50-Säule in H^+ -Form (10 $\cdot$ 0,5 cm mit Vorratskugel) gegeben und nach Einsickern mit etwa 70 ml 0,01m Essigsäure (30 % an Aceton) gewaschen. Dann Elution mit 1m Ammoniak (30 % an Aceton); sie kann mit einer UV-Lampe kontrolliert werden. Das Eluat wird zur Trockne gebracht und das Derivat aus THF /Äther unter Zugabe von einigen Tropfen Cyclohexylamin kristallisiert. Das Derivat von Prolin wurde aus Wasser/THF kristallisiert. Zu Vergleichszwecken genügte es meist, den Rückstand in Aceton aufzunehmen und in dieser Lösung zu den Versuchen einzusetzen.

3. Isolierung von Fettsäuresynthetase

Die Anreicherung folgt einer modifizierten Vorschrift von LYNEN und Mitarbeitern (15) und wurde bei 4°C ausgeführt. Je 125 g frische Bäckerhefe (Scheibe und Schertl KG, Oberkotzau bei Hof) werden mit 175 ml 0,2m K-Phosphatpuffer pH 7,5 und 275 g Glasperlen (Größe 31/10) in einem Zellhomogenisator nach MERKENSCHLAGER, SCHLOSS-MANN und KURZ (64) für 50 bis 60 sec (Stufe 7 bis 9) geschüttelt, dann von den Glasperlen abdekantiert und fehlende Perlen ersetzt.

Die Überstände von 16 derartigen Aufschlüssen werden auf das Volumen von 9,6 ltr gebracht (10-ltr-Stutzen), mit 1,865 kg (35 % Sättigung) geriebenem Ammoniumsulfat (reinst, Merck) versetzt, 10-15 Minuten mit einem Flügelrührer gerührt und bei 3000 g 1 Stunde lang zentrifugiert. Der leicht trübe Überstand wird mit 87 g/ltr Ammoniumsulfat (50 % Sättigung) versetzt und 20 Minuten nachgerührt, bevor für 30 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert wird (AS Ib).

Der gesammelte Niederschlag von 4 derartigen Ansätzen, entsprechend 8 kg Hefe, wird mit H_2O zu 1 Liter aufgefüllt, homogenisiert und in 2 Dialysierschläuche 150 $\cdot$ 3 cm gefüllt. In einer Apparatur nach KUNITZ und SIMMS (65) wird 4-5 Stunden oder über Nacht gegen 70 bis 80 ltr m/500 sekundäre Kaliumphosphatlösung dialysiert, das Dialysat auf eine Proteinkonzentration von 30 mg pro ml verdünnt, an der Glaselektrode mit 0,2n Essigsäure auf pH 5,5 gebracht und mit Calciumphosphatgel nach KUNITZ (66) im Gewichtsverhältnis 1:1 versetzt. Nach Einstellen des pH auf 6,7 mit 0,2n Ammoniak bzw. 0,2n Essigsäure wird 10 Minuten gerührt und dann bei 3000 g 15 Minuten

zentrifugiert. Das Gel wird dreimal mit je einem Liter m/15 Kaliumphosphatpuffer pH 6.5, welcher 0.01m Thioglykol enthält, nach Homogenisieren (Stahlflügelrührer) geplümpert und dann jeweils 10 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert.

Die vereinigten Überstände werden bis 35 % mit Ammoniumsulfat gesättigt, 10 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert und bis 50 % weitergefällt. Die 30 Minuten bei 10 000 g abzentrifugierte Fällung kann einige Tage, wenn sie nicht homogenisiert wird, ohne Verlust der enzymatischen Aktivität aufbewahrt werden (AS IIb).

Die AS IIb-Fällung wird in rund 800 ml 0.1m Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 aufgenommen (10 mg/ml) und 6-7 Stunden bei 100 000 g in der präparativen Ultrazentrifuge (Spinco Modell L 50) zentrifugiert. Die meist schmutziggelbfarbenen Niederschläge werden durch Homogenisieren mit einem Glaskugelplümper in 0.1m KPO₄ pH 6.5 in Lösung gebracht (Vol. rund 200 ml). Das Homogenat wird 20 Minuten bei 37 000 g zentrifugiert, der Überstand, jetzt klar und gelb, wird mit Puffer auf 800 ml verdünnt und erneut bei 100 000 g 6 Stunden zentrifugiert. Der Niederschlag wird in wenig 0.1m KPO₄ aufgenommen (rund 50 ml) mit Ammonsulfat zu 90 % gesättigt, mit 0.01m EDTA und 0.01m Cystein * versetzt und bei -15°C aufbewahrt. Die spezifische Aktivität dieser Präparate beträgt 2000-2500 mE/mg. Ihre Sedimentation in der analytischen Ultrazentrifuge zeigt einen einheitlichen Gipfel.

Die Präparate können für einige Monate ohne Verlust der enzymatischen Aktivität aufbewahrt werden.

Tabelle 13 zeigt den Anreicherungsverfahren **).

Tabelle 13 Anreicherung der Synthetase

Stufe	Protein g	Gesamtaktivität E	spez. Aktivität mE/mg	Ausbeute %
Rohextrakt	692	6120	8.85	100
A.S.I-Überstand	300	5000	16.8	82.5
A.S.Ib dialysiert	125	4750	38.0	77.5
Gel-Eluat	8.7	2460	280	40
Nd. Spinco 2	1.0	2400	2400	39

*) Beim Aufbewahren mit 0.01m Thioglykol erleidet das Enzym im Verlauf einiger Monate irreversible Inaktivierung.

**) Der Zeitbedarf für die Anreicherung beträgt bei zwei Beschäftigten etwa 3-5 g/Woche

4. Bestimmung von Substratkonzentrationen und Enzymaktivitäten

Acetyl-CoA

Acetyl-CoA wird im gekoppelten Test nach OCHOA (51) mit Citratsynthetase bestimmt. *) Mit diesem Test kann auch die spezifische Radioaktivität des eingesetzten C^{14} -Acetyl-CoA kontrolliert werden. Man bestimmt hierzu im optischen Test die eingesetzte Menge, verseift den Küvetteninhalt eine Stunde in 0.1n KOH bei 37°C und trägt Aliquote auf Stahlplättchen auf, mit denen man die Radioaktivität des Rückstandes im Methandurchflußzähler messen kann. Nach jeder Messung wird der Rückstand auf den Plättchen mit 5n Essigsäure eingedrückt und erneut gemessen und zwar so oft, bis die Messung einen konstanten Wert liefert. Dieser gibt die in das Citrat inkorporierten Gesamtimpulse an, die, dividiert durch die gefundene Menge Acetyl-CoA, dessen spezifische Radioaktivität ergeben. Als Blindwert dient die Radioaktivität einer verseiften Probe von Acetyl-CoA, die der gleichen Behandlung unterzogen worden ist.

Malonyl-CoA

Malonyl-CoA wird im optischen Test mit Fettsäuresynthetase bestimmt. 2 ml Gesamtvolumen enthalten in einer Küvette ($d = 1$ cm) 200 μ Mol KPO_4 ; 0.400 μ Mol NADPH, 20 μ Mol Cystein, 0.60 mg Serumalbumin, 0.08 μ Mol Acetyl-CoA und 30 μ g Enzym. Nach drei bis vier Minuten Blindlauf wird mit 0.01-0.02 ml der zu bestimmenden Malonyl-CoA-Lösung die Reaktion gestartet.

Methylmalonyl-CoA

Ein reines Präparat von S-Methylmalonyl-N-caprylcysteamin wurde genau eingewogen und aus der Extinktion bei 236 m μ der molare Extinktionskoeffizient zu $\epsilon = 4400$ berechnet. Sodann wurden Aliquote mit 1 mMol Hydroxylamin im Volumen von 1 ml für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, 0.5 ml 3n HCl zugegeben und schließlich 0.5 ml einer Eisen(III)-chloridlösung, die 0.37m an $FeCl_3$, 0.20m an TCE und 0.66m an HCl war. Aus einer nach dieser Vorschrift aufgenommenen Eichkurve (Abb. 78), die linear war, wurde der Gehalt der Methylmalonyl-CoA Präparationen abgelesen, nachdem sie der gleichen Hydroxylaminolyse unterworfen worden waren. Es sind die angegebenen Zusammensetzungen der Lösung genau einzuhalten, da sonst u. U. erheblich andere Extinktionen erhalten werden.

*) Auswertung nach Buckel (87)

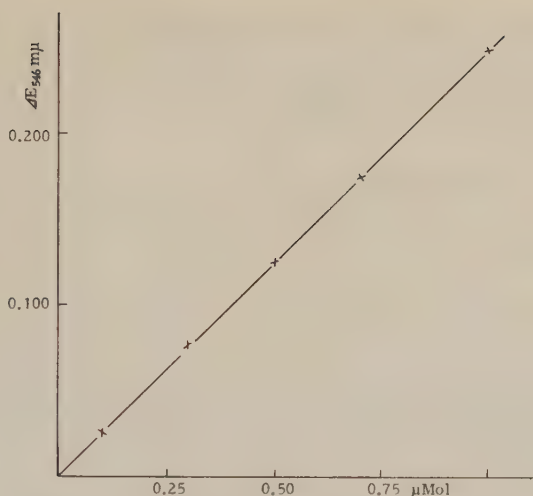


Abbildung 78 Eichkurve für den Hydroxamsäuretest
Ausführung im Text

Coenzym A

Coenzym A wurde nach Überführung in Acetoacetyl-CoA enzymatisch mit β -Hydroxyacyldehydrogenase bestimmt. Eine Küvette ($d = 1$ cm) enthielt: 400 μ Mol Kalium-Pyrophosphat-Puffer pH 7.3, 0.2 μ Mol NADH und 0.05-0.1 μ Mol Acetoacetyl-CoA im Gesamtvolumen von 2 ml. Mit 0.005 ml Enzymlösung (Boehringer) wurde nach zwei bis drei Minuten Blindlauf die Reaktion gestartet und die Abnahme der Extinktion bei 334 m μ beobachtet.

Synthetase-Standardtest

Eine Küvette ($d = 1$ cm) enthielt in 2.0 ml Gesamtvolumen 200 μ Mol KPO_4 pH 6.5, 20 μ Mol Cystein, 0.60 mg Serumalbumin, 0.08 μ Mol Acetyl-CoA, 0.3 μ Mol NADPH und ca. 10 $\uparrow$ Enzym. Nach drei bis vier Minuten langer Beobachtung des Blindlaufes bei 334 m μ und 25°C wird mit 0.15 μ Mol Malonyl-CoA die Reaktion gestartet. Als Einheit ist der Umsatz von 1 μ Mol Malonyl-CoA pro mg Enzym und Minute definiert.

Bei Testreihen wurde eine Stammlösung zubereitet, die Puffer, Cystein, Serumalbumin, NADPH und Acetyl-CoA in den oben angegebenen Konzentrationen enthielt. Sie wurde nicht länger als 6-8 Stunden benützt.

Bei Testreihen der Inhibierung der enzymatischen Aktivität durch JAA oder NÄM wurde die Enzymlösung zu bestimmten Zeiten direkt in Aliquote der Stammlösung pipettiert, die dann gleichzeitig den Stop der Inhibierung bewirkt.

5. Allgemeine analytische Methoden

a) Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde die Methode nach BEISENHERZ (68) verwendet. Hierzu werden 1-5 mg Synthetase in 1 ml H₂O mit 0.15 ml 3m TCE versetzt, das ausgefällte Protein nach Zentrifugieren in 2,5 ml H₂O suspendiert, dann mit 2,5 ml Biuretlösung (1 ltr 0,2n NaOH enthält 9 g K/Na-Tartrat, 3 g CuSO₄ und 5 g KJ) versetzt und nach 30 Minuten die Extinktion der Lösung bei 546 mμ (d = 2 cm) gegen einen Blindwert bestimmt. Linearität gilt etwa bis zur Extinktion 0.350.

Die Methode wurde durch Trockengewichtsbestimmung geeicht. Hierzu wurden Zentrifugengläser in einer Trockenpistole im Ölpumpenvakuum für 8 Stunden bei 100°C über Phosphorpentoxid getrocknet. Nach Abkühlen wird die Pistole kurz geöffnet und das Leergewicht der Gläschen auf der Mikrowaage bestimmt. Man pipettiert Aliquote einer dialysierten Proteinstammlösung ein, kühlt Pistole (Fallenteil) wie Gläschen auf Trockeneistemperatur und evakuiert dann erneut. Nach dem Gefriertrocknen erhitzt man wiederum 8 Stunden auf 100°C und wiegt. Mit dem Vorkühlen wird ein Verspritzen des Inhalts vermieden.

Bereiten der Stammlösung:

Lösungen eines Gehaltes von 8-9 mg/ml wurden 48 Stunden unter zweimaligem Wechseln der Dialysierflüssigkeit gegen m/500 Ammoniak bzw. m/500 KPO₄ dialysiert und vor Gebrauch für 30 Minuten bei 37000 g zentrifugiert. Stammlösungen, die durch Dialysierung gegen m/500 Ammoniak erhalten waren, zeigten einen Biuretfaktor von 8.61 ($\pm 1\%$), während Proteinlösungen, die durch Dialyse gegen m/500 Kaliumphosphatpuffer hergestellt worden waren, einen um durchschnittlich 12% höheren Wert ergaben. Dieser kann, wie sich durch theoretische Abschätzung am Beispiel der Synthetase zeigen läßt, durch das Mehrgewicht des Phosphates bzw. K⁺ als Gegen-Ion der basischen Gruppen bzw. sauren Gruppen am Protein erklärt werden. Für NH₃ beträgt der systematische Fehler etwa 2%. Es wurde deshalb bei allen Proteinmessungen der Faktor 8.61 verwendet.

Bei Lösungen mit einem Proteingehalt unter 3 mg/ml wurde die optische Bestimmungsmethode nach MURPHY und KIES angewendet (69), zu der 1 Paar Quarzküvetten gegeneinander geeicht werden, da bei 215 m μ bereits Abweichungen (bis zu $\Delta E = 0.050$) auftreten.

b) Abtrennung niedermolekularer Radioaktivität

C¹⁴-Acylsynthetase bzw. C¹⁴-Carboxymidomethyl-Synthetase wurde nach den folgenden 3 Methoden von niedermolekularer Radioaktivität befreit:

Sephadex-Filtration:

Die native Proteinlösung (bis 3 ml) wird auf eine mit Sephadex G 25 gefüllte Säule (1.5 · 30 cm), die mit 0.1m Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 äquilibriert worden ist, aufgetragen und mit demselben Puffer eluiert. Die Elution ist bequem mit einer UV-Lampe zu verfolgen (Fluoreszenz des FMN-Anteiles). Auf die gleiche Weise werden auch Synthetaselösungen von SH-Reagenzien befreit (vgl. Vorbemerkung S.113). Die Methode wurde vor allem für die Versuche in Kapitel IV und V angewendet.

Waschen des TCE-denaturierten Proteins:

Der Proteinniederschlag wird im Zentrifugenglas durch Plümpern oder Schütteln mit Glasperlen in 10 ml 0.3m TCE feinst homogenisiert, abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 2000 g, 2 min) und dieser Vorgang sechsmal wiederholt. Diese Methode wurde für die Versuche in Kapitel II und III angewendet.

Abtrennung durch Umfällen:

Der TCE-denaturierte Niederschlag (bis 10 mg) wird im Zentrifugenglas in 0.5 ml Ameisensäure gelöst und das Protein durch Zugabe von 10 ml Äther und Stehenlassen für einige Stunden bei 0°C ausgefällt. Diese Methode ist die unzuverlässigste unter den drei genannten.

c) Acyl-Beladung von Synthetase

Enzym und Acyl-CoA werden in Zentrifugengläsern inkubiert. Die Konzentration des Proteins beträgt 2-5 mg/ml, die des Acyl-CoA ist 10⁻³-10⁻⁶molar. Die Zeitdauer ist für die Acetoacetyl-Enzymbildung 2 Minuten, für die Acetyl-, Malonyl- und Methylmalonyl-Beladung 5 Minuten. Abgestoppt werden die Beladungsreaktionen durch Zugabe

von 3m TCE. Durch 6maliges Waschen mit 0.3m TCE wird das Protein von niedermolekularer Radioaktivität befreit und Aliquote des in 1n Kalilauge, Ameisensäure oder Hyamin gelösten Niederschlages im Scintillationsspektrometer gemessen. Sollte in der gleichen Meßreihe der Thioester-Anteil bestimmt werden, wurde das Acylprotein in Ameisensäure gelöst und Aliquote mit dem gleichen Volumen Perameisensäure versetzt, die in diesem Fall die doppelte Menge Wasserstoffperoxyd, wie auf Seite 127 angegeben, enthält.

d) Radioaktivitätsmessungen

Für die C^{14} -Messung wurde die Methandurchflußzählung für gefärbte Substanzen, sonst die Scintillationszählung benutzt.

Toluol-Scintillationslösung:

1 Liter destilliertes und über Aluminiumoxyd (basisch, Aktivitätsstufe I, Woelm) filtriertes Toluol enthält 5 g 2.5-Diphenyloxazol (PPO) und 500 mg 1.4- bis 2-(4-Methyl-5-Phenyl-oxazol)benzol (Dimethyl-POPOP).

Dioxan-Scintillationslösung (52)

1 Liter destilliertes Dioxan enthält 100 g Naphthalin, 10 g PPO und 250 mg POPOP.

Für die Zählung im Methandurchflußzähler werden die Substanzen in beliebiger Lösung auf Aluminium- oder Stahlplättchen aufgetragen und diese unter der IR-Lampe eingetrocknet. Da hierbei je nach Schichtdicke z. T. erhebliche Selbstabsorption eintritt, wurden steigende Mengen ausgezählt und auf Null extrapoliert. Die Zählausbeuten liegen um 40 %.

In der Scintillationszählung wurden toluollösliche Substanzen in der Zählösung direkt gelöst und gemessen (73 % Zählausbeute), wäßrige Lösungen auf Papierstreifen (Whatmann I, 7 · 3 cm) aufgetragen, eingetrocknet und unter Zählösung gemessen, oder direkt mit Dioxanlösung gemischt und gezählt. C^{14} -beladenes Protein wurde entweder nach Lösen in Kalilauge oder Ameisensäure auf Papier gezählt, oder nach VAUGHAN et al. (88) durch Auflösen in 2 ml 1m Hyamin-Lösung in Methanol (Packard) und Mischen mit 15 ml Zählösung (Zählausbeute 37 %). Für die Zählung von $C^{14}O_2$ nach Absorption in Hyamin siehe Seite 138.

Die Zählausbeuten wurden für jede experimentelle Bedingung neu mit einem C^{14} -Standard ^{*)} bestimmt und die radioaktive Muttersubstanz der jeweiligen Versuche geeicht. Im theoretischen Teil angegebene spezifische Radioaktivitäten beziehen sich auf die unter den Versuchsbedingungen gemessenen Zählausbeuten.

B) Beschreibung der Versuche

Zu Kapitel II: Gleichgewichtsmessungen

1. Kondensationstest

Der Test wird wie von LYNEN angegeben ausgeführt (12). Die Inkubationslösung enthielt in 0.55 ml Gesamtvolumen 2 μMol $\text{KHCO}_3\text{-}C^{14}$ (spez. Aktivität 600 000 $\text{IpM}/\mu\text{Mol}$ bei 54 % Zählausbeute), 50 μMol Trispuffer pH 7.5, 5 μMol Cystein, 5 μMol Trilon und 0.15 μMol Coenzym A. In den Messungen der Zeit- und Enzymabhängigkeit wurden jeweils 30 μMol S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin eingesetzt, bei der Substratabhängigkeit Mengen entsprechend der Abszisse. Mit Synthetase wurde die Reaktion bei 25°C gestartet und im Standardtest nach 15 Minuten mit 0.5 ml 5n Essigsäure abgestoppt. Zur vollständigen Entfernung des überschüssigen $C^{14}\text{O}_2$ wurde für 1 bis 2 Stunden in einem 80°C heißen Wasserbad erhitzt, dann das gesamte Volumen mit 15 ml einer Dioxan-Scintillationslösung gemischt und die fixierte Radioaktivität in der Probe gezählt. Zur Messung der Enzymaktivität wurden jeweils Kurven mit 5 Meßpunkten aufgenommen.

2. Quantitative Analyse des Acetoacetylenenzym

Das ausgefällte Protein (für den Ansatz siehe theor. Teil) wird abzentrifugiert und durch Plümpern im Zentrifugenglas mit 3 ml 0.3m TCE zweimal gewaschen. Die vereinigten Überstände werden zur Rückbestimmung der Substrate aufbewahrt, der Protein Niederschlag mit 100 μMol S-Acetoacetyl-N-acetylcysteamin, 0.5 ml 6n KOH und 5 ml Wasser versetzt und für zwei Stunden bei 30°C gehalten. Die Lösung wird mit 50proz. Schwefelsäure angesäuert und in einem 100-ml-Kölbchen unter Zusatz von 2 Tropfen Siliconentschäumer (Wacker-Chemie) in eine Vorlage destilliert, die 200 μMol 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2n HCl enthält. Das ausgefallene Hydrazon wird durch dreimaliges Ausschütteln mit je 3 ml Tetrachlorkohlenstoff in Lösung gebracht und

^{*)} C^{14} -n-Hexadecan bzw. C^{14} -Na-Pelargonat mit bekanntem Curie-Gehalt

die CCl_4 -Phase nach zweimaligem Waschen mit Wasser auf eine Säule ($0.6 \cdot 15$ cm mit Vorratskugel) gegeben, die mit Aluminiumoxid-Pulver (stand. nach Brockmann) gefüllt ist. Das adsorbierte Acetonhydrazon wird leicht mit Benzol eluiert, während das freie Hydrazin auf der Säule verbleibt. Nach Eindampfen des Eluates wird der Rückstand aus 96proz. Äthanol umkristallisiert. Die gelborangefarbenen Nadeln besitzen einen Schmelzpunkt von $124-126^\circ\text{C}$. Eine 0.01M Lösung dieser Substanz in 96proz. Äthanol wird in Mengen von 0.01 , 0.02 , 0.04 , 0.06 , 0.08 und 0.1 ml auf Aluminiumplättchen gut verteilt, unter der IR-Lampe getrocknet und die Radioaktivität der Proben im Methandurchflußzähler gemessen. Dividiert man die gemessenen Impulse der 6 Proben jeweils durch ihr Volumen und trägt diese Zahl gegen das Volumen auf, so kann man durch Extrapolation auf Null die Selbstabsorption der Proben eliminieren. Die spezifische Radioaktivität des Hydrazons, die auch bei mehrmaligem Umkristallisieren innerhalb einer Fehlergrenze von $\pm 3\%$ konstant blieb, ergibt mit 100 multipliziert die gesamte inkorporierte Radioaktivität. Im Blindversuch einer Inkubation ohne Malonyl-CoA konnte keinerlei Radioaktivität im Acetonhydrazon festgestellt werden, was bedeutet, daß kein mitgeschlepptes C^{14} -Acetat die Meßwerte verfälscht.

3. Rückbestimmung der Substrate

Die vereinigten Waschwässer werden dreimal mit peroxidfreiem Äther ausgeschüttelt und bei Z. T. am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wird in 1 ml 1M Trispuffer pH 8.1 gelöst und von 0.5 ml im optischen Test mit Citratsynthase der Acetyl-CoA-Gehalt bestimmt. Mit je 0.2 ml werden Malonyl-CoA und Coenzym A im optischen Test mit Synthetase bzw. β -Hydroxylacyldehydrogenase bestimmt (Seite 127).

4. Gleichgewichtsmessung für die Acyl-Beladungsgleichgewichte

Sie folgen der Vorschrift auf Seite 123, nur werden der Inkubationsmischung variierende Coenzym A- und Acyl-CoA-Mengen zugefügt.

Zu Kapitel III: Zur Verteilung der Acyl-Reste auf die Substratbindungsstellen der Synthetase

1. Thioesteranalyse des Acetat-Restes (24)

Die hier gegebene Vorschrift stellt für den Acetat-Rest eine Alternativmethode zu der nachfolgend beschriebenen Peroxidation in Lösung dar und wurde auch für das Erkennen von Thioester-Peptiden auf Elektropherogrammen und Papierchromatogrammen verwendet.

Die ameisensauren Proteinlösungen werden auf 3 cm breiten Papierstreifen als Flecken eingetrocknet und über ein Gestell aus Glasstäben gehängt, das sich in einem Exsikkator mit 40 cm Durchmesser befindet. Sein unterer Teil enthält 200 ml frisch bereitete Per-ameisensäurelösung (siehe unter 2). Nach Evakuieren beläßt man den Streifen über Nacht im Exsikkator bei Zimmertemperatur und überführt ihn dann in einen zweiten Exsikkator, der KOH in fester Form enthält und ebenfalls evakuiert wird. Nach 2-3 Stunden wird der Streifen in 7 cm lange Stücke zerschnitten und die einzelnen Flecke unter Toluol-Scintillationslösung gezählt. Handelt es sich um Pherogramme, wird die Lage der radioaktiven Gipfel im Streifenzähler ermittelt.

2. Peroxidation von Acylsynthetase

8 ml Ameisensäure werden mit 1 ml Wasser und 1 ml 30proz. Wasserstoffperoxid versetzt und 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Das gewaschene Acylprotein wird in 1 ml dieser Mischung gelöst und 4 Stunden bei 0°C gehalten.

Abtrennung der entstandenen freien Säuren:

Im Falle der Acetyl-Synthetase genügt ein Eindampfen von Aliquoten der Lösung auf Whatman-I-Papier unter der IR-Lampe (Abzug!), um die C¹⁴-Essigsäure zu entfernen.

Die verbliebene Radioaktivität wird unter Toluolscintillationslösung gezählt. Kontrollversuche ergaben ein Verbleiben von höchstens 3% freier Essigsäure am Papier.

Für die Analyse von Malonyl- und Methylmalonyl-Synthetase mußte ein anderes Verfahren angewendet werden. Aliquote (meist 0.2 ml) werden als Flecken von rund 1.2 cm auf Whatman-I-Papierbogen (30.40 cm) 6 cm von einem Ende entfernt aufgetragen.

Dann wird mit Pyridin/Acetat-Puffer pH 6.2 (Pyridin 9, Essigsäure 1, Wasser 90) vorsichtig besprüht, Überschuß an Puffer auf Filterpapier entfernt und das Blatt der Hochspannungspapieroelektrophorese nach WIELAND und PFLEIDERER bei einer Feldstärke von 30-40 V/cm (90 mA) für eine Stunde unterworfen.

Nach dem Trocknen werden die Startpunkte in der Größe 3.7 cm ausgeschnitten und wie oben unter Toluolscintillationslösung gezählt. Auch bei dieser Methode zeigten Kontrollversuche die Wirksamkeit der Abtrennung und keinen Verlust durch mechanischen Kontakt.

3. Thioesteranalyse des Acetoacetat-Restes

Die Inkubationslösung enthielt im Volumen 4 ml: 400 μMol KPO_4 pH 6.5, 0.52 μMol C^{14} -Acetyl-CoA, 0.68 μMol Malonyl-CoA, 80 μMol Cystein und 19.5 mg Enzym (1200 mE/mg). Nach 2 Minuten bei 0°C wurde mit 0.60 ml TCE die Reaktion gestoppt und das denaturierte Protein nach Abzentrifugieren dreimal mit 0.3m TCE gewaschen, dann der Niederschlag einmal mit Äther extrahiert. Das Protein wird zusammen mit 100 μMol S-Acetoacetyl-N-acetylcystein in 3 ml 0.05m KPO_4 pH 7.5 suspendiert und mit 0.35 ml 0.1m Kaliumboratlösung 10 Minuten bei 20°C inkubiert. Dann dampft man die angesäuerte (H_2SO_4) Lösung ein, nimmt den Rückstand in 2 ml PAS auf und beläßt 4 Stunden bei 0°C . Durch Ätherzugabe wird das Protein wieder ausgefällt und der Überstand nach Trocknen mit Natriumsulfat mit einer ätherischen Lösung von Diazomethan bei 0°C bis zur bleibenden Gelbfärbung und dem Aufhören der Gasentwicklung versetzt. Nach Abziehen des Äthers bei Z. T. werden Aliquote des in Essigester aufgenommenen Rückstandes der Radiogaschromatographie unterworfen.

Die Ausbeute des Verfahrens ist gering, sie betrug 15 %.

Neben dem β -Hydroxybuttersäuremethylester treten zwei weitere, nicht identifizierte Substanzen auf. Das ausgefällte Protein wurde der alkalischen Hydrolyse in 0.6n KOH 12 Stunden bei 40°C unterworfen, mit 100 μMol β -Hydroxy-Buttersäure versetzt und nach Ansäuern 6 Stunden mit Äther perforiert. Nach Trocknen mit Natriumsulfat wurde der Extrakt wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Herstellung der Diazomethanlösung:

In einem Erlenmeyer-Kolben werden 100 ml Äther mit 14 ml 45proz. KOH unterschichtet und portionsweise 7 g gepulverter Nitrosomethylharnstoff, hergestellt nach (70), bei 0°C unter Rühren eingetragen.

Bedingungen der Radio-Gaschromatographie:

Eichversuche mit authentischem β -Hydroxy-Buttersäuremethylester im Bereich der Messung ergeben Linearität zwischen eingespritzter Menge und ermittelter Gipflfläche, ebenso ist diese bei gleicher Menge dem Verstärkungsfaktor des Apparates umgekehrt proportional.

Säule: $^{11}\frac{1}{8}$ " · 150 cm, 20 % Neopentylglykol-succinat-Polyester an 80 % Cromosorb
W/AW, 80-100 mesh.

Ofentemperatur: 107°C

Injektortemperatur: 100°C

Detektortemperatur: 245°C (Wärmeleitfähigkeitsdetektor)

Gasstrom: 24,6 ml He/min

Retentionszeit des β -Hydroxy-Buttersäuremethylesters unter diesen Bedingungen:
21 Minuten

Verbrennungsofentemperatur: 740°C

Verbindungsleitung: 260°C

4. Inhibierung durch NÄM und JAA

SH-freie Enzymlösung wird 0,01m an Hemmstoff gemacht und 10 Minuten bei 0°C inkubiert. Dann gibt man Cystein (neutral) bis zur Endkonzentration 0,1m zu und setzt die Lösung nach weiteren 10 Minuten in die Beladungsreaktion ein.

5. Peptidanalyse von Acetylsynthetase

a) Beladung und Pepsinspaltung

0,5-7 g Protein werden aus der Stammlösung entnommen, 1:4 mit Puffer verdünnt und nach 5stündigem Zentrifugieren in der präparativen Ultrazentrifuge (Spinco 30 000 UpM) in einem minimalen Volumen 0,1m Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 aufgenommen (zweistündiges Rühren). Nach einstündiger Vorinkubation in 0,01m Cystein wird mit der rund 20fachen Menge C^{14} -Acetyl-CoA versetzt, 5 Minuten inkubiert und die Lösung in das 5fache Volumen eiskalter Trichloressigsäure (0,3m) unter Rühren eingegossen. Die Deacylasewirkung beträgt bei 25°C in 5 Minuten etwa 5 μ Mol pro Gramm, d.h. verringert bei 0°C die Substratkonzentration nicht entscheidend.

Die sorgfältig gewaschene C^{14} -Acetylsynthetase (zuletzt mit H_2O oder einmal mit Äther digeriert!) wird feinst homogenisiert und in 0,01m HCl in einer Konzentration von 1 g pro Liter suspendiert. 1/10 der Gewichtsmenge Pepsin in 20 ml 0,01m HCl suspendiert wird zugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur unter Rühren für durchschnittlich 40 Stunden inkubiert. Etwa 10 Minuten nach Beginn der Verdauung erhält man bereits eine klare Lösung. Nach 24 Stunden Verdauungszeit wird 1/40 des Gewichtes an Pepsin erneut zugegeben. Die Lösung wird eingedampft,

in wenig Pyridin/Formiat-Puffer 0.05m^{*)} pH 6.25 aufgenommen und vom ausgefallenen Pepsin abzentrifugiert. Der Pepsinniederschlag wird dreimal mit demselben Puffer ausgewaschen und die vereinigten Überstände erneut eingedampft. Der Rückstand wird im Puffer in einer Konzentration von 50-100 mg/ml aufgenommen (bezogen auf verdautes Protein), die Radioaktivität gemessen, der pH geprüft, notfalls mit Pyridin auf 6.25 gebracht und die Lösung der Säulenchromatographie unterworfen.

b) Säulenchromatographie

Als Säulen wurden an einem Ende zu einer Spitze ausgezogene Glasrohre verwendet, die einer gründlichen Reinigung mit Chromschwefelsäure und destilliertem Wasser unterzogen worden waren. Auf eine kleine Glaskugel am sich verjüngenden Teil der Säule folgt eine $\frac{1}{2}$ cm hohe Schicht Quarzsand, auf die unmittelbar das Austauschermaterial gefüllt wird. Verschllossen ist die Säule durch einen Quetschhahn; es wurde Sorge getragen, daß der abführende Schlauch von entsprechend kleinem Durchmesser war, um eine laminare Strömung zu gewährleisten. Die Länge der Säulen betrug 1-2 m (Zahlen siehe theor. Teil), der Durchmesser richtete sich nach der aufgetragenen Hydrolysatmenge. Für die DEAE-Sephadex-Säule gilt als Richtwert 5 cm² Querschnitt pro Gramm Hydrolysat.

c) Vorbereitung des Austauschermaterials

DEAE-Sephadex wurde nach den Angaben der Firma Pharmacia, Uppsala, vorbereitet und nach Überführen in die Formiatform das gewaschene Gel mit Pyridin neutralisiert (pH 6.25). Mit 0.05m Pyridin/Formiat-Puffer wird dreimal jeweils 1 Stunde gerührt und dann auf einer groben Fritte abgesaugt. Durch Evakuieren in einer Saugflasche wird das Gel entlüftet und anschließend in die, wie oben beschrieben, vorbereiteten Säulen gefüllt, die bis zu einem Drittel ihrer Höhe mit Puffer gefüllt sind. Nach Einfüllen des Materials werden die Säulen mit etwa dem 15fachen ihres Volumens unter einem Druck von 2 Meter Wassersäule mit Pyridin/Formiat-Puffer pH 6.25 (0.05m) äquilibriert. Der pH des Eluates wurde an der Glaselektrode kontrolliert.

*) Die Molaritäten der jeweiligen Puffer beziehen sich bei den Anionenaustauschern auf das Anion d.h. Formiat, bei den Kationenaustauschern auf das Kation, d.h. Pyridin. Im theor. Teil ist das Ion, nach dem sich die Molarität richtet jeweils unterstrichen.

Für den CM-Sephadex gilt das für den DEAE-Sephadex Gesagte. Er wurde in die Pyridiniumform übergeführt, mit Ameisensäure auf pH 3.4 gebracht und mit 0,1m Pyridiniumformiat pH 3.4 äquilibriert.

Bei der Dowex-Chromatographie wurde die Type 50 · 2 (200-400 mesh) in der Pyridiniumform gebraucht, die nach TOMASEK (71) vorbereitet wurde.

d) Auftragen des Gemisches und Elution

Das salzfreie Gemisch wird bei der Anionenaustauscher-Chromatographie um jeweils 0.5 pH-Einheiten über dem pH des ersten Puffers aufgetragen, bei der Kationenaustauscher-Chromatographie 0.5 pH-Einheiten unterhalb. Nach Einsickern wird noch zweimal mit wenig Puffer nachgespült und dann kontinuierlich eluiert. Das Eluat wird in Fraktionsgläsern aufgefangen, das Volumen richtet sich nach der Größe der Säule, Richtwert: Säulenvolumen zu Fraktionsvolumen = 200:1.

Zum Testen des Eluates werden 0,05 ml jeder zweiten Fraktion auf Whatman-I-Papierstreifen 3 · 7 cm aufgetragen, unter der IR-Lampe getrocknet und unter Scintillationslösung (Toluol) gezählt.

Test auf Ninhydrin-positive Substanzen: Aliquote jeder zweiten Fraktion werden in einem Teströhrchen mit 1 ml Ninhydrinreagens nach STEIN und MOORE (33) versetzt, 15 Minuten auf 100°C erhitzt, nach Abkühlen mit 4 ml einer Mischung Äthanol/Wasser 1:1 versetzt und die Extinktion bei 570 mμ bestimmt.

Tüpfeltest: Je 1 Tropfen als Fleck auf Papierbogen eintrocknen, mit 0,2proz. Lösung von Ninhydrin in Aceton besprühen und 3 Minuten bei 100°C entwickeln.

Radioaktive Gipfel wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingeeengt und noch verbleibendes Pyridinformiat durch Eindampfen im Ölpumpenvakuum bei 30°C entfernt.

e) Elektrophorese und Papierchromatographie

Das verwendete Papier war grundsätzlich Whatman-III-Papier. Für alle Operationen bei Elektrophorese und Papierchromatographie wurde mit sorgfältig gereinigten Geräten gearbeitet, und – zum Vermeiden von Verunreinigungen durch Fingerabdrücke – in Handschuhen.

Elektrophorese: Als Gerät stand die Hochspannungselektrophorese nach MICHL (34) zur Verfügung, die eine maximale Laufstrecke von 70 cm bei einer Feldstärke von maximal 40 Volt/cm bot. Das Peptidgemisch wurde in die Mitte eines 76 · 46 cm

großen Papierbogens als 36 cm breite, möglichst scharfe Bande aufgetragen und das Papier nach Trocknen mit Puffer so besprüht, daß die benetzende Flüssigkeit die Auftragszone verschmälerte.

- Verwendete Puffer:
1. Ameisensäure/Essigsäure-Puffer pH 1.9 (5 ml Essigsäure
7.5 ml Ameisensäure pro Liter)
 2. Pyridinacetat-Puffer pH 3.5 (0.5 ml Pyridin, 5 ml
Essigsäure pro Liter)
 3. Pyridinacetat-Puffer pH 6.2 (5 ml Pyridin, 0.5 ml Essigsäure
pro Liter)

Die Laufzeiten betrugen 2-6 Stunden, danach wurde das Papier bei 30-40°C getrocknet, in Kontakt mit einem Geiger-Müller-Zählrohr die Lage der radioaktiven Banden grob ermittelt und dann das Papier mit Agfa-Röntgenpapier (35,6 · 43,2 cm) in Kontakt gebracht und die Lage der beiden Papiere fixiert. Die Dauer der Belichtungszeit richtete sich nach den aufgetragenen Impulsen und betrug durchschnittlich 40 Stunden pro 10⁶ über die Strecke von 36 cm aufgetragener Impulse. Man erhielt so sehr starke, gut auswertbare Schwärzungen.

Zusammensetzung des Entwicklers: 5 g Metol, 120 g Natriumsulfit · 7 H₂O, 120 g Kaliumcarbonat, 1.5 g Kaliumbromid und 8 g Hydrochinon werden heiß in 1 Liter Wasser gelöst und nach Erkalten 1:4 mit Wasser verdünnt. Entwicklungszeit 3-10 Minuten.

Fixierbad (Schnellfixierer): 1 Liter enthält 200 g Natriumthiosulfat, 50 g Ammoniumchlorid und 20 g Kaliumpyrosulfit (Dauer der Fixierung 10 Minuten).

Nach Trocknen des Fotopapieres wird auf dem Pherogramm die Lage der radioaktiven Banden angezeichnet und diese ausgeschnitten.

Papierchromatographie: Auf Whatmann-III-Papierbogen (46 · 56 cm) wurde 8 cm vom oberen Rand entfernt das Peptidgemisch in einer 36 cm breiten Linie aufgetragen, oder der nach Radioautographie ausgeschnittene Streifen der Elektrophorese mit einer Nähmaschine an dieser Stelle eingenäht.

Äquilibration 4-6 Stunden

Temperatur 25°C

Entwicklungsdauer 14-20 Stunden

Lösungsmittelsysteme:

1. n-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 1 = A
2. tert.-Butanol : sek.-Butanol : Wasser = 1 : 4 : 3 = B
3. Phenol : n-Butanol : Eisessig : Wasser = 3 : 3 : 2 : 4 = C
4. Phenol : n-Butanol : Eisessig : Wasser = 1.5 : 3 : 2 : 4 = D

Identifizierung: Radioautographie (siehe Elektrophorese) Elution: Nach Ausscheiden der Banden und Annähen entsprechender Streifen wird in einer geschlossenen Kammer, deren Wanne 5proz. Essigsäure enthält, eluiert. Das Eluat wird eingedampft und auf Radioaktivität geprüft. Die Ausbeuten schwanken zwischen 40-80 %.

f) Salzsaurer Totalhydrolyse nach STEIN und MOORE (38)

Proben werden in 5.8n, zweimal destillierter HCl in einem dickwandigen Reagenzglas nach Evakuieren (Ölpumpenvakuum) und mehrmaligem Auftauen und Einfrieren eingeschmolzen und 20 Stunden bei 110°C gehalten (geschlossene Blechbüchse!). Nach Öffnen der Bombe wird ihr Inhalt zur Trockne gebracht und in 0.5 ml 0.2m Na-Citratpuffer pH 2.2 aufgenommen.

6. Nachweis von Serin als der den 4'-Phosphopantethein-Rest tragenden Aminosäure

2.9 ml einer wäßrigen Lösung des reinen zentralen Peptides (46 μ Mol) wurden zur Trockne gebracht und in 0.5 ml 0.2n NaOH bei 37°C für eine halbe Stunde inkubiert, dann neutralisiert und erneut eingedampft. Der Rückstand wurde in 1.5n HCl gelöst und quantitativ im Volumen 1.4 ml in ein Reagenzglas (dickwandig) gebracht, dieses nach Evakuieren abgeschmolzen und für 90 Minuten bei 110°C gehalten. Nach Abkühlen und Öffnen der Bombe wurde eine Menge entsprechend 10 μ Mol abgezweigt, und der Rest mit 1.5 ml einer 1proz. Lösung von 2.4-Dinitrophenylhydrazin in 2n HCl versetzt und 4 Stunden stehen gelassen. Die Lösung wurde nun fünfmal mit destilliertem Essigester (je 3 ml) extrahiert, dieser Extrakt nach Waschen mit 5 ml Wasser, fünfmal mit je 5 ml 10proz. Natriumcarbonatlösung extrahiert. Die wäßrige Phase wurde zweimal mit 10 ml Essigester gewaschen, dann angesäuert und erneut viermal mit je 10 ml Essigester extrahiert.

Nach Abdampfen des Essigesters wurde ein Fünftel des in 0.2 ml Äthanol aufgenommenen Rückstandes, theoretisch 2.5 γ entsprechend, mit 2.5 γ authentischem Pyruvatphenylhydrazon als Vergleich zur Papierchromatographie mit wasserge-

sättigtem Butanol als Laufmittel eingesetzt. Als Träger wurden Whatman-I-Bogen mit 40 cm Länge verwendet, die Laufzeit betrug 10 Stunden, die Temperatur 25°C, die Äquilibrierungszeit 1 Stunde. In demselben System wurde auch die Nichtidentität des Produktes mit dem Phenylhydrazon des α -Ketobutyrate gezeigt.

Die vor der Umsetzung zum Phenylhydrazon abgezweigten 10 μ Mol in 0.3 ml wurden mit NaOH neutralisiert und Aliquote der enzymatischen Umwandlung zu Lactat unterworfen. Der Testansatz (siehe auch Eichkurve Abb. 79) enthielt in einem Gesamtvolumen von 0.15 ml 50 μ Mol Trispuffer pH 7.5, 30 μ Mol NADH und 2-4 μ Mol Pyruvat, bezogen auf eingesetztes Peptid. d = 1 cm (Spezialküvette). Gestartet wurde die enzymatische Reaktion durch Einspritzen von 2 μ ltr Lactatdehydrogenase entsprechend 3.4 μ . Gemessen wurde die Abnahme der Extinktion bei 334 m μ .

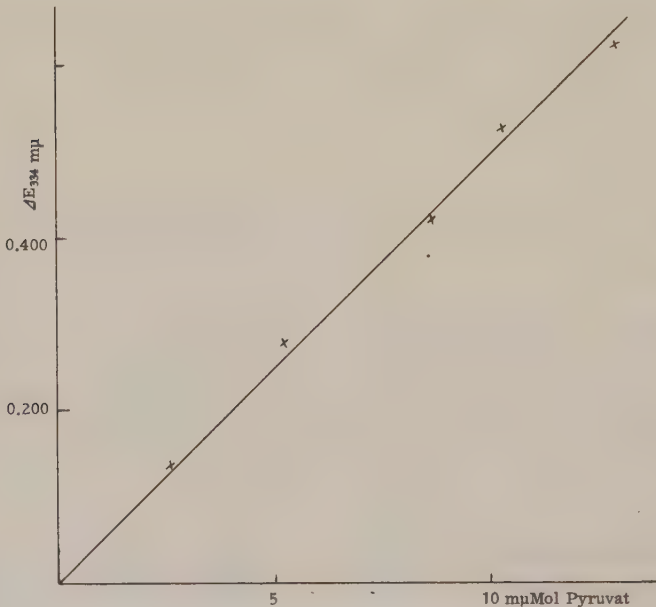


Abbildung 79 Eichkurve für die Pyruvatbestimmung
Ausführung im Text

7. Van-Slyke-Oxidation des zentralen Peptides (72)

5 μmol des Peptides wurden in einem Volumen von 0,12 ml mit 2 μmol NaNO_2 und 16 μmol HCl drei Minuten auf 96°C erhitzt, dann abgekühlt und mit 4 μmol Amidosulfonsäure versetzt. Nach einigen Minuten wurde die Lösung zur Trockne gebracht und der Rückstand in 0,5 ml 5,8n HCl für 20 Stunden bei 110°C der Totalhydrolyse unterworfen. Parallel hierzu wurde eine Probe von 3 μmol unverändertes Peptid hydrolysiert. Die Analyse der entstandenen Aminosäuren geschah durch Überführung in ihre Dansyl-Derivate und analytische Dünnschichtchromatographie.

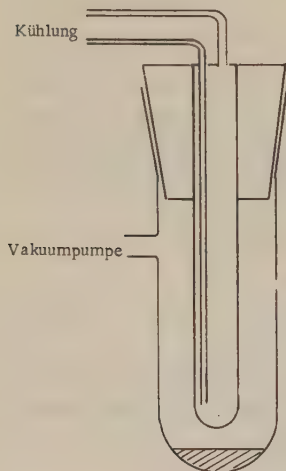
8. Analyse der Dansyl-Aminosäuren

Die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G-Platten ($20 \cdot 20$ cm) wurde exakt nach der Vorschrift von SEILER und WICHMANN (40, 74) ausgeführt. Drei Lösungsmittelsysteme standen für die Trennprobleme zur Verfügung:

- A) Methylacetat : Isopropanol : konz. Ammoniak = 45 : 35 : 25 (V/V)
- B) Chloroform : Methanol : Eisessig = 75 : 20 : 5 (V/V)
- C) Chloroform : Äthylacetat : Methanol : Eisessig = 30 : 50 : 20 : 1 (V/V)

Die Aminosäurederivate wurden in einem Gemisch von Wasser und Aceton 1 : 2 gelöst und mit einer 10- μl -tr-Spritze 3 cm vom linken und unteren Rand entfernt aufgetragen. Zuerst erfolgt Entwicklung entgegen der Streichrichtung mit Lösungsmittelgemisch A. Die Laufstrecke beträgt 15 cm, danach wird die Platte 10 Minuten bei 110°C getrocknet. Diese Bedingung ist, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, exakt einzuhalten. Nun entwickelt man mit System B oder C in der Streichrichtung. Die Lösungsmittelgemische (100 ml pro Wanne) wurden nicht länger als 24 Stunden benutzt, da eine bedeutende Abhängigkeit der R_f -Werte von dem Alter der Gemische, insbesondere bei System A, zu beobachten war. Die Laufzeit der Chromatogramme beträgt 1,5 bis 2 Stunden. Zur Sichtbarmachung der Flecken wurde eine UV-Lampe verwendet, mit der Mengen von 1 μmol sehr gut erkannt werden können. Zur Identifizierung wurde eine Schablone bzw. Vergleichssubstanzen benutzt.

9. Edmann-Abbau im Millimikromol-Maßstab nach HARTLEY (75)



Käufliches Phenylisothiocyanat (Schuchardt) wurde in der nebenstehenden Apparatur frisch destilliert (Ölpumpenvakuum), vom Kühlfinger mit Aceton in ein Schliffkölbchen gespült, das Aceton abgezogen und mit Pyridin (KOH, vakuumdestilliert) eine 5proz. Lösung (V/V) bereitet.

30 μ mol des Peptides wurden in 0,2 ml Wasser in einem 25-ml-Spitzkolben mit 0,4 ml der oben beschriebenen Lösung versetzt und die Mischung über Nacht bei Z.T. stehengelassen; dann, nach Zugabe von 0,4 ml Wasser, das Pyridin und das überschüssige Phenylisocyanat durch dreimaliges Ausschütteln mit 4 ml destilliertem Benzol entfernt, und die verbleibende Lösung lyophilisiert.

Danach Zugabe von 0,4 ml Essigsäure (p.a., destilliert), die mit HCl-Gas gesättigt ist, und nach 0,5 Stunden bei Z.T. Stehen erneutes Lyophilisieren. Der Rückstand wird in 0,2 ml Wasser gelöst, 1/10 der Gesamtmenge für die Endgruppenanalyse abgezweigt und der gesamte Vorgang in dem gleichen Kölbchen wiederholt.

Die zur Endgruppenbestimmung entnommene Menge wird 0,1m an Kaliumbicarbonat gemacht und mit 20 μ ltr einer 1proz. Lösung von Dansyl-Cl in Aceton in einem Teströhrchen (7 · 3 cm) versetzt und nach drei bis vier Stunden bei Z.T. die Lösung lyophilisiert. Der Rückstand wird in 0,1 ml 5,8n HCl (zweimal destilliert) gelöst und, nach Evakuieren, im zugeschmolzenen Röhrchen 6-7 Stunden bei 110°C gehalten. Die Analyse der Endgruppen wird wie auf Seite 135 ausgeführt.

10. Umsetzung des peripheren Peptid-Thioesters zum Thioäther

Abbildung 80 zeigt einen Kontrollversuch mit N,S-Diacetyl-cysteamin^{*)}, der belegt, daß unter den Versuchsbedingungen die gewünschte Umsetzung eintritt.

^{*)} Freundlicherweise von Dr. H. Eggerer, Institut für Biochemie der Universität München, überlassen.

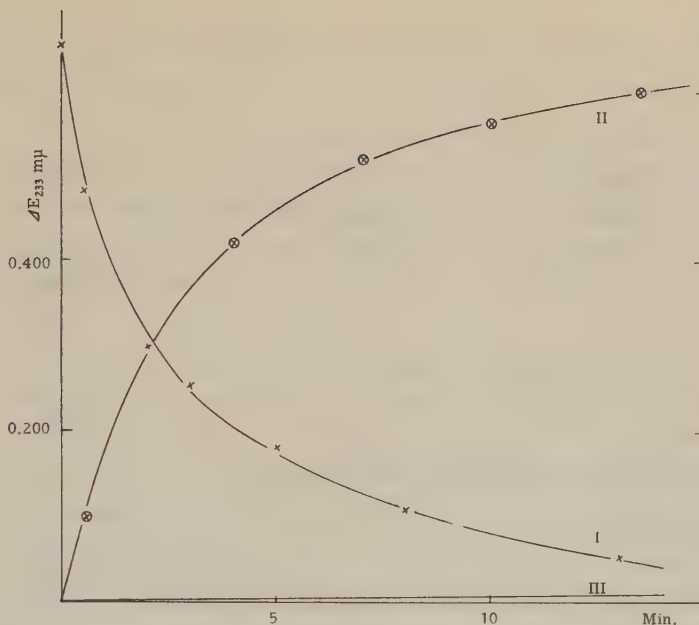


Abbildung 80 Umwandlung von N,S-Diacetylcysteamin in das Carboxamidomethyl-Cysteaminderivat

- I: Abnahme der Thioesterabsorption bei 230 mμ in N/20 KOH (M/100 N,S-Diacetylcysteamin)
 II: wie I, Aliquote werden mit 10⁻³ M Ellmanns Reagenz versetzt und die Extinktion bei 405 mμ gemessen
 III: wie I, zusätzlich M/10 JAA; Messung wie unter II.

40 μMol des Peptides wurden unter identischen Bedingungen wie in Abbildung 80 unter Zugabe von C¹⁴-JAA (1,5 · 10⁶ IpM/μMol) umgesetzt und das Gemisch 3 Stunden der Papierelektrophorese bei pH 3,5 und 40 V/cm unterworfen. Die Peptidbande wandert identisch dem Acetylthioester. Sie wurde ausgeschnitten und nach Elution mit Dansyl-Cl umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde strichförmig auf eine mit Kieselgel G beschichtete Glasplatte (20 · 20 cm) gebracht und mit Chloroform : Methanol : 25proz. Annoniak = 2 : 2 : 1 nach WIELAND (76) entwickelt. Die gelb fluoreszierende Hauptbande (R_f = 0.92) wurde nach Trocknen der Platte mit einem Spatel in ein dickwandiges Reagenzglas abgeschabt und darin der Totalhydrolyse unterworfen. Blindversuche hatten ergeben, daß durch die Gegenwart von Kieselgel die Hydrolyse nicht gestört, bzw. Aminosäuren anschließend an das Kieselgel nicht adsorbiert werden.

Zu Kapitel IV: Die Reaktion von Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid mit Synthetase

1. Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten

Unmittelbar vor Beginn des Versuches wurde eine bestimmte Enzymmenge der Stamm-Stammlösung entnommen und über die Sephadex-G₂₅-Säule filtriert. Die enzymatische Aktivität betrug 1700 mE/mg, der Proteingehalt der Lösung 5-7 mg/ml. Aliquote dieser Lösung wurden mit JAA- bzw. NÄM-Lösungen bei 0°C bis zur vorgegebenen Endkonzentration versetzt und in bestimmten Zeitabständen Aliquote in eine Stop-Lösung pipettiert, die 0.1m an KPO₄ pH 6.5, und 0.01m an Cystein war. Mit 0.01 ml aus dieser Lösung wurde die enzymatische Aktivität im Synthetasestandardtest gemessen.

2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH

Die Versuchsanordnung folgt der unter 1. mit dem Unterschied, daß die Enzymlösung auf eine mit nur 0.05m KPO₄ pH 6.5 äquilibrierte Säule aufgetragen und mit demselben Puffer eluiert wurde. Aliquote dieser Lösung wurden zur Konzentration 0.1m mit dem Puffer des jeweiligen pH versetzt und JAA bzw. NÄM zugegeben. Zwischen pH 5.5 und 7.5 wurde Phosphatpuffer, zwischen 7 und 9 Trispuffer, und zwischen 9-10.5 Bicarbonat-Puffer verwendet (Glycin reagiert bei pH 10 mit NÄM). Die Inhibitorkonzentration waren $3 \cdot 10^{-3}$ molar für JAA und $1 \cdot 10^{-3}$ molar bis $4 \cdot 10^{-5}$ molar für NÄM.

3. Decarboxylierung von Malonyl-Coenzym A

a) Methode I:

Im Hauptraum eines Warburggefäßes befinden sich 0.5 ml Enzymlösung, 0.1m an KPO₄ pH 6.5. Der Einsatz enthält einen gefalteten Streifen Papier (Whatman I, 3.5 cm), der mit 0.15 ml einer einmolaren Lösung von Hyamin in Methanol getränkt wird. Der Seitenarm wird mit 0.4 ml 3m TCE gefüllt. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von 0.14 µMol 3-C¹⁴-Malonyl-CoA. Nach einer vorgegebenen Zeit stoppt man die Reaktion durch Kippen und läßt 2 Stunden bei Z.T. stehen, dann wird das Papier in ein Zählgläschen überführt, der Einsatz einmal mit 0.2 ml und zweimal mit 0.1 ml Methanol ausgespült, 15 ml Scintillationslösung zugegeben und nach einer Stunde gemessen.

b) Methode II:

Im Hauptraum eines geeichten Warburggefäßes befinden sich 1 ml Enzymlösung 0.1m an KPO_4 -Puffer pH 6.5, der Seitenarm enthält in 0.2 ml 1.5 μMol Malonyl-CoA. Das Gefäß wird an einen Manometer befestigt und bei 25°C im Wasserbad temperiert. Nach erfolgtem Druckausgleich wird das System geschlossen und durch Kippen die Reaktion gestartet. Die Druckzunahme wird in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt, als Kontrolle dient ein Thermobarometer.

c) Methode III:

2 ml 0.1m Trispuffer pH 8.1 enthalten 5 μMol Malat, 3 μMol NAD^+ , 0.6 mg Serumalbumin, 2 E Malatdehydrogenase, 0.8 E Citratsynthetase und 0.15 μMol Malonyl-CoA. Man verfolgt den Blindlauf über einige Minuten, startet dann mit Synthetase und verfolgt die Zunahme der Extinktion bei 334 m μ .

4. Schutzversuche mit Acetyl-CoA

1 ml Sephadex G 25 filtrierte Enzymlösung (spez. Aktivität: 2000 mE/mg, 2.75 mg) wurde bei Eisbadtemperatur mit 1 μMol Acetyl-CoA (SH-frei) versetzt und nach 5 Minuten Vorinkubation 1 μMol JAA hinzugefügt. Zu bestimmten Zeiten wurden 0.03 ml in 0.07 ml einer Stammlösung für den Synthetasestandardtest pipettiert und mit 0.01 ml nach einigen Minuten die enzymatische Aktivität bestimmt. Die Kontrollkurve wird durch Messung ohne Acetyl-CoA erhalten.

5. Temperaturabhängigkeit der C^{14} -JAA-Beladung von Synthetase

Eine Lösung von Synthetase (900 mE/mg; 43 mg/ml) in 0.2m KPO_4 pH 6.5 wurde zum Zeitpunkt 0 zu 10^{-3} molar mit C^{14} -Jodacetamid versetzt und bei den Temperaturen 0, 15, 25 und 37 Grad C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben von 2.15 mg in eine Lösung von 10 mg Serumalbumin und 10 μMol Thioglykol in einen Milliliter Wasser pipettiert und nach 3-4 Minuten das Protein durch Zugabe von TCE gefällt. Das gewaschene Protein wurde in Hyamin gelöst und wie üblich gezählt (vgl. S. 124). Die Abnahme der enzymatischen Aktivität wurde gleichzeitig kontrolliert.

6. Spaltung von C^{14} -Carboxamidomethyl-Synthetase durch proteolytische Enzyme

a) Peptische Spaltung

230 mg Synthetase (2500 mE/mg) gelöst in 10 ml 0.1m KPO_4 pH 6.5 wurden mit C^{14} -Jodacetamid ($3.1 \cdot 10^6$ IpM/ μ Mol bei 55 % Zählausbeute) bis zur Endkonzentration 10^{-3} molar bei $0^\circ C$ versetzt und der Fortgang der Reaktion an der Abnahme der enzymatischen Aktivität verfolgt. Als sie unter 1 % gesunken war, wurde das Protein durch Zugabe von TCE denaturiert und, wie unter der Vorschrift für Acetylpeptide zu lesen, weiterbehandelt.

b) Tryptische Spaltung

Vorbereitung wie unter a). Das gewaschene Protein wird in 0.1m Trispuffer pH 8.1 (0.001m an Ca^{2+}) feinst suspendiert, und mit einem Zehntel seines Gewichtes mit Trypsin (dreimal umkristallisiert, chymotrypsinfrei) versetzt. Nach kurzer Zeit erhält man eine klare Lösung. Nach 4 (bzw. 12) Stunden wird die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht, der Rückstand in 50proz. Essigsäure gelöst und der Gelfiltration an Sephadex G_{50} unterworfen.

Für präparative Zwecke wurde in 50proz. Essigsäure 24 Stunden gequollenes G_{50} -Gel vorsichtig in eine Säule (6.5 · 130 cm) sedimentiert, deren Ausgang durch eine Glaskugel und Quarzsand verschlossen ist; Betthöhe 70 cm. Ein konisches Glasrohr, mit einem Netz als unteren Boden, wird in die Säule auf das Gelbett gesetzt und das zu trennende Gemisch einpipettiert. Man vermeidet so Unregelmäßigkeiten der Oberfläche (30).

7. DEAE-Sephadex-Chromatographie und Fingerprintanalyse

a) Eine DEAE-Sephadex-Chromatographie (Type A_{50}) zeigt für T_A wie T_B einen einzigen Gipfel, der mit dem Auftragspuffer (pH 7.8; Collidin Acetat) erscheint. Ausführung wie für die Acetylpeptide beschrieben.

b) Proben von 20 000 IpM wurden in PAS 4 Stunden bei $0^\circ C$ oxidiert, die Ameisensäure abgezogen und der Rückstand mit Dansyl-Cl für 3 Stunden in 0.1m $KHCO_3$ -Lösung stehengelassen (vgl. S.118). Nach Eindampfen werden die Substanzen fleckenförmig in der Mitte eines Papierbogens 8 cm vom oberen Rand entfernt aufgetragen und im Lösungsmittelsystem Phenol : Butanol : Eisessig : Wasser = 0.5 : 3 : 2 : 4 chromatographiert. Nach Trocknen wurde an beiden Seiten 15 cm breite

Papierstreifen angenäht, vorsichtig mit Elektrophorese-Puffer pH 3.5 besprüht und der Bogen für 2 Stunden bei einer Feldstärke von 25 V/cm in der Michlapparatur belassen. Nach abermaligem Trocknen und Radioautographie ergab sich die Einheitlichkeit der beiden Peptide durch:

T_A :*) R_f 0.74; Elektrophoretische Mobilität: $1.5 \cdot 10^{-5}$ (cm²/V sec)
(als Kation)

T_B : R_f 0.69; Elektrophoretische Mobilität: $5.5 \cdot 10^{-5}$ (cm²/V sec)
(als Anion)

Für T_A war vollständige Abtrennung von anderen, durch Fluoreszenz sichtbaren Peptiden eingetreten, für T_B Abtrennung der Hauptmenge.

8. Produktanalyse der Fettsäuresynthetase-Reaktion

Sie folgt exakt der Vorschrift von LYNEN und Mitarbeitern (15), unterschied sich von ihr nur in der Analysenmethode der Produkte. Der saure Petrolätherextrakt wurde nach Waschen mit Wasser mehrmals mit Wasser eingedampft, um das Octanol, welches bei der Extraktion zur Verhinderung von Emulsionsbildung zugegeben war, zu entfernen. Der trockene Rückstand wurde dann in Äther gelöst und mit einer ätherischen Lösung von Diazomethan bis zur bleibenden Gelbfärbung versetzt. Nach einigen Minuten wurde der Äther verdampft und der in Essigester aufgenommene Rückstand der Gaschromatographie unterworfen.

Zu Kapitel V.: Versuche zum Gesamtkomplex

1. Messung der Deacylaseaktivität von Synthetase (vgl. 77)

Eine SH-freie Synthetaselösung (0.1m KPO₄) der Proteinkonzentration 10-20 mg/ml wird mit 10⁻³ molarem Ellmanns-Reagens versetzt und bei 25°C inkubiert, bis sich die Extinktion bei 405 mμ nicht mehr ändert (etwa 30 Min.). Aliquote dieser Lösung (bis 2 mg) werden in einer 0.001m Lösung von 5.5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (Ellmanns-Reagens, DTNB) in 0.1m KPO₄ mit 0.15 μMol Acetyl-CoA versetzt und die eintretende Zunahme der Extinktion bei 405 mμ beobachtet. Grundlage der

*) Bei PAS-Oxidation traten manchmal 2 schwache Nebenflecken auf, mit den Mobilitäten als Kation: 4.9 und $3 \cdot 10^{-5}$ (cm²/V sec).

Aktivitätsberechnung ist der Extinktionskoeffizient von DTNB bei 405 m μ ; er beträgt hier 98 % des Maximums bei 413 m μ und zwar 13300 (mMol/cm²). Die Reaktion mit Cystein ist unter diesen Bedingungen unmeßbar rasch.

2. Diisopropyl-fluorophosphat-Hemmung von Synthetase

Zu 0,25 ml einer sephadexfiltrierten Enzymlösung (11 mg/ml; 1000 mE/mg; 0,1m an KPO₄) wird zur Zeit Null eine bestimmte Menge 1 : 100 mit 0,1m KPO₄ verdünntes DFP gegeben und die Mischung bei 25°C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten werden 0,01 ml dieser Lösung zu 1,97 ml einer Synthetase-Testmischung (Zusammensetzung siehe S.121) gegeben und nach 2 Minuten Blindlauf die Reaktion durch Zugabe von 0,15 μ Mol Malonyl-CoA gestartet.

3. Schutzversuche vor DFP

Ausführung wie unter 2. (vgl. auch S.139). Synthetase und Acyl-CoA werden 5 Minuten bei Null Grad vorinkubiert, und dann DFP zugegeben; Kontrollkurve ohne Acyl-CoA; zu den Zeiten der Abszisse werden Aliquote für den Test entnommen.

4. Peptidanalyse nach DFP-Einwirkung und Acylbeladung

75 mg Enzymprotein (600 mE/mg; 15 mg/ml) in 0,1m KPO₄ wurden mit DFP versetzt (10⁻²molar Endkonzentration) und bei 25°C inkubiert (B). Eine Parallelprobe enthielt kein DFP (A). Nach einer Stunde betrug die enzymatische Aktivität von B nur mehr 2,5 % von A; A wie B wurden zu 10⁻³ molar mit Methylmalonyl-CoA versetzt (13,5 $\cdot$ 10⁶ IpM/ μ Mol) und nach 5 Minuten die Inkubationsansätze identisch wie auf S.129 für Acetylpeptide beschrieben weiterbehandelt. Die spezifische Beladung betrug für A wie B 2,3 (Mol Methylmalonat/Mol Enzym).

5. Nachweis von Fettsäurederivaten in Synthetasepräparationen

26 mg Synthetase wurden nach MORTON (82) mit 20proz. wäßrigem Butanol extrahiert, wobei das Protein ausfällt. Der Butanolextrakt wurde geteilt und die eine Hälfte unmittelbar mit Diazomethan nach Abdampfen des Butanols und Aufnehmen in Äther verestert, die zweite Hälfte in 10 ml 20proz. methanolischer KOH 12 Stunden Rückfluß gekocht, nach Ansäuern (H₂SO₄) viermal mit 5 ml Petroläther (K_p 30-50°C) extrahiert und der Rückstand des Extraktes in Äther mit Diazomethan verestert. Aliquote der in Essigester aufgenommenen Rückstände werden gas-chromatographisch analysiert:

Säule: $\frac{1}{8}$ " · 200 cm, 15 % Neopentylglykol-succinat-Polyester an Chromosorb W/AW,
80-100 mesh.

Ofentemperatur: 180°C

Injektortemperatur: 245°C

Detektortemperatur: 305°C

Gasstrom: 20 ml He/Min.

Flammenionisationsdetektor, Empfindlichkeit: 100 · 2

VII. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Es wurden die Gleichgewichtskonstanten der Kondensationsreaktion sowie zwei ihrer Teilschritte gemessen. Die erhaltenen Werte stimmen mit den aus anderen Messungen geforderten gut überein.

Der von LYNEN postulierte Mechanismus der Bildung von Acetoacetyl-Enzym aus Malonyl-CoA, Acetyl-CoA und Enzym wurde bestätigt und weiterhin gezeigt, daß auch die transferierenden Teilenzyme der Synthetase die Acylreste kovalent, aber nicht als Thioester binden und für eine deacylierende Nebenaktivität der Synthetase verantwortlich sind. Der Weg des Acetat-Restes zur "peripheren" SH-Gruppe führt über die "zentrale" SH-Gruppe, wodurch verhindert wird, daß an einem Enzymmolekül die Synthese einer neuen Kette beginnt, bevor der fertige Acyl-Rest des vorangegangenen Zyklus das Enzym verlassen hat.

Es wurde ein Peptid isoliert, welches den Acetat-Rest als Thioester des 4'-Phosphopantetheins trägt, das seinerseits als Phosphodiester über einen Serin-Rest an die Peptidkette gebunden ist. Die Aminosäureumgebung des 4'-Phosphopantetheins ist von der im Acyl Carrier Protein aus *Escherichia coli* verschieden.

Die Inhibierungsreaktionen der enzymatischen Aktivität unter Beteiligung von Jodacetamid und N-Äthylmaleinimid wurden untersucht, ihre Geschwindigkeit gemessen und gezeigt, daß JAA, welches nur mit der "peripheren" SH-Gruppe reagiert, dies pH-unabhängig tut, was durch eine Aktivierung der Thiolgruppe durch benachbarte, basische Aminosäuren gedeutet werden kann. NÄM reagiert dagegen mit der "peripheren" und der "zentralen" SH-Gruppe, mit der letzteren jedoch schneller und in einer pH-abhängigen Reaktion, wie es mit dem Bild einer isolierten SH-Gruppe am Ende eines molekularen "Armes" gut übereinstimmt.

Durch die Reaktion mit JAA wird die Synthetase in eine Malonyl-CoA-Decarboxylase umgewandelt. Eine Erklärung für diese Umwandlung wurde gegeben. JAA reagiert in einer zweiten, 20mal schnelleren Reaktion mit dem Enzym und gibt ihm dadurch die Fähigkeit, aus Malonyl-CoA mit NADPH ohne Acetyl-CoA Fettsäuren zu synthetisieren. Ein tryptisches Peptid, das den Carboxamidomethyl-Rest trägt, wurde aus diesem Enzym isoliert und in seiner Zusammensetzung angegeben.

Es wird postuliert, daß Acetyl-CoA nicht nur als Substrat sondern auch als Aktivator der Fettsäuresynthese dient und daß Jodacetamid diese zweite Funktion des Acetyl-CoA modellartig erfüllt, das Enzym jedoch dabei alkyliert.

Ein räumliches Modell des Synthetasemoleküls als morphologisch Dimeres wird vorgeschlagen und durch experimentelle Befunde gestützt.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Birch, A.J., in L. Zechmeister: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Bd. 14 S. 186, Springer-Verlag, Wien 1957
- 2) Lynen, F. und M. Tada, Angew. Chemie 73, 513 (1961)
- 3) Woodward, R.B., Angew. Chemie 68, 13 (1956); 69, 50 (1957)
- 4) Lipmann, F., Les Prix Nobel en 1953, S. 151, Stockholm 1954
- 5) Lynen, F., Angew. Chemie 67, 463 (1955)
- 6) Brady, R.O., Proc. Natl. Acad. Sc. U.S. 44, 993 (1958)
- 7) Lynen, F., J. cell.comp.Physiol. 54, suppl. 1, 33 (1959)
- 8) Wakil, S.J. und J. Ganguly, J. Am. Chem. Soc. 81, 2597 (1959)
- 9) Vagelos, P.R., J. Am. Chem. Soc. 81, 4119 (1959)
- 10) Lynen, F., Domagk, G.F., Goldmann, M. und I. Kessel, Biochem. Z. 335, 519 (1962)
- 11) Lynen, F., S.B. bayer. Akad. Wiss., Sitzung vom 4. März 1960
- 12) Lynen, F., Fed. Proc. 20, 941 (1961)
- 13) Hartmann, G. und F. Lynen, in: P.D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck: The Enzymes, Vol. 5 381; Acad. Press New York und London 1961
- 14) Lynen, F., in: Biogen. delle sos. nat., VII corso est. di chim. S. 205, Rom 1964
- 15) Lynen, F., Hopper-Kessel, I. und H. Eggerer, Biochem. Z. 340, 95 (1964)
- 16) Hagen, A., Dissertation, Univ. München 1963
- 17) Schweizer, E., Dissertation, Univ. München 1963
- 18) Toomy, R.E., u. S.J. Wakil, J. biol. Chem. 241, 1159 (1966)
- 19) Johnson, M.J., in P.D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck: The Enzymes, Vol. 3 411; Acad. Press New York, London 1960
- 20) Kurahashi, K., Pennington, R.J. und M.F. Utter, J. biol. Chem. 226, 1059 (1957)
- 21) Kielland, J., J. Am. Chem. Soc. 59, 1675 (1937)
- 22) Rauen, H.M., Biochemisches Taschenbuch S. 656, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1956
- 23) Lynen, F., Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen, Gem. Tagung der Ges. für physiol. Chemie und der österr. biochem. Ges. Wien 26.-29. Sept. 1962
- 24) Harris, I., Meriwether, B.P. und J. Harting-Park, Nature Lond. 197, 154 (1963)
- 25) Lynen, F., The Third Jubilee Lecture, Biochem. J., 102, 381 (1967)
- 26) Schweizer, E., unveröffentlichte Versuche
- 27) Bernhard et al., J. cell. comp. Physiol., 54, Suppl. 1 195 (1959)
- 28) Yalpani, M. und K. Willecke, unveröffentlichte Versuche

- 29) Chan, W. und E. Schweizer, unveröffentlichte Versuche
- 30) Jauch, R., unveröffentlichte Versuche
- 31) Rudloff, V. und G. Braunitzer, Hoppe Seyler's Z. für physiol.Chem., 323, 129 (1961)
- 32) Michl, H., Mnh.Chem. 82, 489 (1951)
- 33) Moore, S. und W.H. Stein, J.biol.Chem., 176, 367 (1948)
211, 907 (1954)
- 34) Michl, H., Chromatogr. Reviews, Vol. I 11, Elsevier Publ.Comp. 1959
- 35) Grassmann, W. und K.Hannig, Hoppe-Seyler's Z. für physiol.Chemie 292, 32 (1953)
- 36) Bailey, J.L., Techniques in Protein Chemistry S. 52 Elsevier Publ. Comp.
Amsterdam, London, New York 1962
- 37) Wells, W.W., Schultz, J. und F. Lynen, Biochem. Z. 346, 474 (1967)
- 38) Crestfield, A.M., Moore, S. und W.H. Stein, J.biol.Chem. 238, 622, 625 (1963)
- 39) Patchornik, A. und M.J. Sokolorsk, J. Am. Chem. Soc., 86, 1206 (1963)
- 40) Seiler, N. und H. Wiechmann, Hoppe-Seyler's Z. für physiol.Chemie 337, 229 (1964)
- 41) Gray, W.R. und B.S. Hartley, Biochem. J. 82, 59P (1963)
82, 379 (1963)
- 42) Tang, J., Nature 199, 1095 (1963)
- 43) Rabin B.R. und Holloway, Diskussion zu: B.R. Rabin und A.P. Mathias in:
Mechanismen enzymatischer Reaktionen 14. Koll. der Ges. für physiol.
Chemie S. 121 Springer Verlag Göttingen, Berlin, Heidelberg 1964
- 44) Webb, J. L., Enzyme and Metabolic Inhibitors Vol. III, 12 Acad. Press
New York, London 1966
- 45) Gregory, J. D., J. Am. Chem. Soc. 77, 3922 (1955)
- 46) Bergmeyer, H. U., Biochem. Z. 324, 408 (1953)
- 47) Di Sabato, G. und N.O. Kaplan, Biochemistry 2, 776 (1963)
- 48) Kirschner, E., unveröffentlichte Versuche
- 49) Bogen, K. und J.-G. Helmcke in Zusammenarbeit mit Preuss, A. und P.
Hofschneider, unveröffentlichte Messungen
- 50) Pilz, J., Herbst und O.Kratky, unveröffentlicht
- 51) Ochoa, S., in: S.O. Colowick und N.O. Kaplan, Methods in Enzymology I
687 Acad. Press New York, London 1955
- 52) Werbin, H., Chaikoff, J. L. und M.R. Imada, Proc.Soc.exp.biol.Medicin,
102, 8 (1959)
- 53) Eggerer, H. und F. Lynen, Biochem. Z. 335, 540 (1962)
- 54) Overath, P., Stadtman, E.R., Kellermann, G.N. und F. Lynen, Biochem.Z.
336, 77 (1962)
- 55) Eggerer, H., Stadtman, E.R. und P. Overath, Biochem. Z. 333, 1 (1960)
- 56) Matsuhashi, M., Matsuhashi, S. und F. Lynen, Biochem. Z. 340, 263 (1964)

- 57) Kuhn, R., und Quadbeck, G., Chem.Ber. 84, 844 (1951)
- 58) Flavin, M., Ortiz, P.J. und S. Ochoa, Nature 176, 823 (1955)
- 59) Numa, S., Ringelmann, E. und F. Lynen, Biochem. Z. 340, 228 (1964)
- 60) Vagelos, P.R., J. Am. Chem. Soc., 81, 4119 (1959)
- 61) Wessely, L., Dissertation, Univ. München 1955
- 62) Vogelmann, D., Diplomarbeit, Univ. München 1952
- 63) Hartley, B.S. und V. Massey, Biochim. Biophys. Acta 21, 58 (1956)
- 64) Merckenschlager, M., Schlossmann, K. und W. Kurz, Biochem. Z. 329, 332 (1957)
- 65) Kunitz, M. und H.S. Simms, J. gen. Physiol. 11, 641 (1928)
- 66) Kunitz, M., J. gen. Physiol. 35, 423 (1952)
- 67) Decker, K., Dissertation, Univ. München 1955
- 68) Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czod, R., Garbade, K.H., Meyer-Ahrendt, E. und G. Pfleiderer, Z. für Naturf. 8b, 555 (1953)
- 69) Murphy, J.B. und M.W. Kies, Biochim Biophys. Acta 45, 382 (1960)
- 70) Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie I 395
- 71) Tomasek, V., Holeysorsk, V., Mikes, O. und F. Sorm, Biochim. Biophys. Acta 38, 570 (1960)
- 72) Van Slyke, D.D., J. biol. Chem. 9, 185 (1911)
- 73) Simon, E.J. und D. Shemin, J. Am. Chem. Soc. 75, 2510 (1953)
- 74) Pataki, G., Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, Walter de Gruyter und Co., Berlin 1966
- 75) Gray, W.R. und B.S. Hartley, Biochem. J. 89, 579 (1963)
- 76) Wieland, Th. und D. Georgopoulos, Biochem. Z. 340, 476 (1960)
- 77) Lands, W. und P. Hart, J. Biol. Chem. 240, 1905-11 (1965)
- 78) Majerus, P.W., Alberts, A.W. und P.R. Vagelos, J. biol. Chem. 240, 4723 (1965)
- 79) Pugh, E.L. und S.J. Wakil, J. biol. Chem. 240, 4727 (1965)
- 80) Hsu, R.Y., Wasson, G. und J.W. Porter, J. biol. Chem. 240, 3736 (1965)
- 81) Brooks, J.L. und P.K. Stumpf, Biochim. Biophys. Acta 98, 213 (1965)
- 82) Morton, R.K., Nature 166, 1092 (1950)
- 83) Reed, L.J. und D.J. Cox, Ann. Rev. of Biochem. 35, 610 (1966)
- 84) Nemethy, G. und H.A. Scheraga, J. chem. Phys., 36, 3401 (1962)
- 85) Isherwood, F.A. und D.H. Cruickshank, Nature (London) 173, 121 (1954)
- 86) Calvin, D., Frontall, N. und G. Toschi, Nature (London) 163, 568 (1949).
- 87) Buckel, W. und H. Eggerer, Bio. Z. 343, 29-43 (1965)
- 88) Vaughan, M., D. Steinberg und J. Logan, Science 126, 446 (1957)

LEBENS LAUF

Am 10. November 1940 wurde ich in München geboren. Meine Eltern sind Dr. jur. Egon Oesterhelt und Trude Oesterhelt, geb. Pfohl.

Nach dem Besuch der Volksschule trat ich 1950 in das humanistische Theresien-Gymnasium in München ein und schloß meine Schulzeit 1959 mit dem Abitur ab. Im Wintersemester des gleichen Jahres begann ich das Chemie-Studium an der Universität München. Die Diplom-Vorprüfung legte ich im Wintersemester 1961 ab, im Sommersemester 1963 die Diplom-Hauptprüfung. Von Februar 1964 bis Mai 1967 führte ich am Max-Planck-Institut für Zellchemie unter Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen die vorliegende Diplom- und Doktorarbeit aus.

